STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN AN DER ISOLIERTEN MENSCHLICHEN FETTZELLE

Gerhard Schneider

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551922_0060

Druck- und Verlagsanstalt
Werner Blasaditsch · 89 Augsburg · Theodor-Heuß-Platz 3 · Telefon (0821) 51 85 63
Printed in Germany

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. E. Buchborn

STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN AN DER ISOLIERTEN MENSCHLICHEN FETTZELLE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
G e r h a r d S c h n e i d e r
aus Augsburg

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. K. SCHWARZ

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 9. 1974

UNIV. LEIDEN BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.0	DARSTELLUNG DER TECHNIK	3
2.1	Fettgewinnung	3
2.2	Isolierung der Fettzellen	3
2.3.0	Inkubation	7
2.3.1	C-14-Glucose	7
2.3.2	Lipolyse	10
3.0	Bezugsgröße der Ergebnisse	13
3.1	Zellzahl	13
3.2.0	Index DNA/Triglyceridgehalt	15
3.2.1	DNA Bestimmung	16
3.2.2	Triglyceridbestimmung	19
4.0	AUSFÜHRUNG DER TECHNIK	20
4.1	Isolierung	20
4.2.0	Inkubationsansätze	22
4.2.1.1.	C-14-Glucose	23
4.2.1.2.	C-14 Messung	24
4.2.2.	Lipolyse	25
4.3	Glycerinbestimmung	25
5.1	Zellzahl	28
5.2	DNA - Bestimmung	28
5.3	Triglyceridbestimmung	33
6.1	Stoffwechseluntersuchungen: Insulin, T_3,T_4	35
6.2	Ergebnisse der Voruntersuchungen	35

Seite

7.1.1. Kollektiv Normalgewichtig/Adipös 39
7.1.2. Adipös : Definition 40
7.2 Beschreibung des ausgewerteten Versuches 42
7.3 Beschreibung der verwendeten Statistik 44

8. ERGEBNISSE 48

9. DISKUSSION 54

10. ZUSAMMENFASSUNG 62

Literaturverzeichnis 64

1. EINLEITUNG

Mit zunehmender Häufigkeit der Adipositas in unserer Gesellschaft rückt die Stoffwechsellage des Fettgewebes und ihre Beeinflußbarkeit immer mehr ins praktische klinische Interesse. So ist das Auftreten von z.B. Hochdruck und Diabetes in eindeutiger Weise gehäuft bei dicken Patienten. Durch Verringerung des Körpergewichtes können diese Leiden gebessert, ja geheilt werden [1-4]. Des weiteren ist durch die Fettsucht die Sterblichkeitsquote bei vielen Krankheiten beträchtlich erhöht. Ein weiterer Beweggrund für die Behandlung der Adipositas wäre, daß viele dieser Patienten unter einem psychischen Leidensdruck eine Gewichtsreduzierung anstreben. (Hier ließe sich die Frage stellen, inwieweit die Entstehung der Adipositas durch Symptomwandel einer psychischen Fehlentwicklung oder Fehlhaltung auf dem Hintergrund einer somatischen Gegebenheit und einer soziokulturellen Geprägtheit bedingt ist [5-10]).

Die konsequenteste Methode die Adipositas zu behandeln besteht in einem länger befristeten totalen Nahrungsentzug. Diese Null-Diät bewirkt ein Umstellen des Körpers auf die endogene Energiequelle Fett, deren Freisetzung durch die Gabe von Schilddrüsenhormonen noch forciert wird. Ein Hauptproblem bei der allgemeinen Stoffwechsellage und der Behandlung der Adipositas wird in der Unterempfindlichkeit der Fettzellen Adipöser gegenüber hormonaler Stimulation gesehen. So berichtet Salans, Knittle und Hirsch [11], daß größere Fettzellen eine geringere Wirkung auf den Einfluß von Insulin zeigen, ja sie erwägen sogar eine indirekte Proportionalität zwischen Zellgröße und Stoffwechselantwort. Die Befunde von Preiss et alt. [12] ergeben eine gleiche basale Lipolyse bei Normalgewichtigen und Adipösen, jedoch eine verminderte Stimulation durch Noradrenalin in Abhängigkeit vom Körpergewicht.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Stoffwechselaktivität,

speziell der Lipolyse des menschlichen Fettgewebes. Dabei soll untersucht werden, ob sich bei unseren verwendeten Hormonen ein Unterschied im Stoffwechsel der Fettzellen Normalgewichtiger gegenüber Adipöser ergibt. Als stimulierende Hormone werden dabei Insulin, Trijodthyronin und Thyroxin verwand . So kann eine Aussage gemacht werden über den hormonellen Einfluß von T_3 und T_4 auf die Lipolyseaktivität und die gegenteilige Wirkung von Insulin speziell an der menschlichen Fettzelle.
Reaktionssubstrat bei unseren Untersuchungen stellt die isolierte Fettzelle dar. So läßt sich eine gezielte Aussage über den Fettstoffwechsel machen, ohne störende Stoffwechselaktionen z.B. des Bindegewebes in Betracht ziehen zu müssen. Des weiteren ist bei den isolierten Fettzellen die Diffusionsstrecke vom Medium in die Fettzelle bei allen Zellen gleich - im Gegensatz zu Gewebsbröckchen. Auch das praktische Arbeiten mit isolierten Fettzellen ist der fat-pad-Methode vorzuziehen, da sich hier schnell eine wesentlich genauere Aufteilung der Zellen (ohne unterschiedliche Bindegewebsbeimengung) in die einzelnen Inkubationsgefäße erzielen läßt.

Die technische Ausführung der Zellisolierung und Inkubation lehnt sich an die Promotionsarbeit von L. Krick [13] an, der bereits Untersuchungen ähnlicher Art am Nebenhodenfettgewebe von Ratten durchgeführt hat.

2.0. DARSTELLUNG DER TECHNIK

2.1. FETTGEWINNUNG

Verwendet wurde subcutanes Bauchfettgewebe, das zu Operationsbeginn, nachdem der Hautschnitt gelegt und das Fettgewebe bis zur Fascie durchpräpariert war, entnommen wurde. Die Spender waren Patienten der Chirurgischen Universitätsklinik, die ausser nach ihrem Fettansatz so ausgewählt wurden, daß tunlichst keine Stoffwechselkrankheiten vorhanden waren. Es wurde Wert darauf gelegt, das Fett zu Operationsbeginn zu bekommen, um ein längeres Einwirken des Vollnarkotikums auf das Fettgewebe und einen möglicherweise störenden Einfluß durch das Offenliegen des Fettes am Wundrand zu vermeiden, auch wenn James (71)[14] keinen störenden Einfluß von Narkotika auf den Zellstoffwechsel findet (siehe auch Mosinger(65)[15] und Galton und Bray (1967)[16] und Krick(73)[13]). Das entfernte Fett wurde in ein Gefäß mit Albuminpuffer (s.u.) gegeben, das Gefäß verschlossen und zur Temperierung in ein Dewargefäß mit ca. 37 °C warmem Wasser gegeben.

2.2. ISOLIERUNG DER FETTZELLEN

Die Fettzellen wurden mittels Kollagenase aus dem Gewebsverband herausgelöst[17-19]. Verwendet wurde dabei Kollagenase der Fa. Worthington, die außer Kollagenase - gewonnen aus Cl. histolyticum - zusätzlich eine Peptidase und eine trypsinähnliche Proteinase enthält. Verwendete reine Kollagenase zeigte unbefriedigende Ergebnisse, sowohl an Rattenfettgewebe wie an menschlichem. Unsere verwendete Kollagenase löst das Fettgewebe des Rattennebenhodens nach 90 min Inkubation im Schüttelgerät bei 37 °C vollkommen auf, so daß die isolierten

Fettzellen im Medium vorliegen - nicht so bei menschlichem Fettgewebe. Wohl war immer ein bestimmtes Quantum an freien Fettzellen vorhanden, der größte Teil lag jedoch noch kompakt vor. Die Fettgewebsbröckchen waren etwa erbsengroß oder etwas kleiner und wurden von dem massiven Fettbrocken abgeschnitten, um der Kollagenase in der Inkubationslösung eine größere Angriffsfläche zu bieten - daß durch das Zerschneiden ein Teil der Zellen zerstört wird, muß dabei in Kauf genommen werden.

Eine erste Erklärung dafür, daß die Brocken sich nicht auflösten war, daß im Vergleich zum Rattenfettgewebe, bei dem die Fettzellen in ein mehr oder weniger zartes Bindegewebe von annähernd gleicher Konsistenz von Ratte zu Ratte (gleicher Rattenstamm, gleiches Rattengewicht) eingebettet sind, beim Menschen doch erhebliche Varianzen im Bindegewebsbau des Fettgewebes bestehen. Um dieser Situation gerecht zu werden, wurde versucht vom selben Fettgewebe verschiedene Proben zu inkubieren und dabei bei jeweils konstanter Kollagenasemenge die Inkubationszeit zu variieren. Vom noch verbleibenden Fettgewebe wurde ein Kryostatschnitt angefertigt und HE gefärbt. Ergäbe sich nun bei gegebener Kollagenasemenge bei einer bestimmten Inkubationszeit für ein bestimmtes Gewebe, dessen Eigenart durch das histologische Praeparat festgehalten ist, die völlige Auflösung des Bindegewebes, so könnte man bei einem neu aufzulösenden Gewebe einen Schnitt anfertigen, diesen mit vorhandenen Schnitten vergleichen und so rückschließend sagen, das Gewebe muß so und so lange inkubiert werden.
Doch dieses komplizierte Unterfangen führte nicht zum Erfolg, da niemals innerhalb 90 min eine Auflösung des Fettgewebes zustande kam.
Um mit den wenigen freien Zellen Versuche anstellen zu können, wurden diese durch ein Gauzefilter von den noch vorhandenen Fettbröckchen getrennt. Übte man nun auf die Fettbrokken im Gauzefilter einen sanften Druck aus oder drückte sie

mit einem Plastikstäbchen gegen die Gauze, so ließen sich die Zellen nahezu vollständig aus ihrem Gewebsverband lösen, zurück blieb nur gröteres Bindegewebe. Dieses Verfahren ist möglich bei konstanter Inkubationszeit (60 min) und gleicher Kollagenasekonzentration (1000 U/ml) bei jedem menschlichem subcutanen Fettgewebe.
Dabei wurden in den allermeisten Fällen relativ wenige Zellen zerstört - als unbedeutende, minimale durchsichtige Triglyceridschicht über der Fettzellsuspensionsschicht erkennbar. Ein größerer Zellzerfall trat zuweilen beim Auswaschen der Kollagenase auf (s.u.) ; bei diesem Vorgang wechseln Aufschütteln der Fettzellsuspension mit sanfter Zentrifugation. Diese Zerstörung mag zustande kommen durch Vorschädigung bei dem mechanischen Eingriff der Zellisolierung, mag an der individuellen Schwachheit der Zellwand oder einem Angriff der Kollagenase auf die Zellwand liegen.Durch die stärkere mechanische Belastung bei der Zentrifugation und dem Aufschütteln kann es dann zur Ruptur der Zellen kommen. Die Variation in der spezifischen Reaktionsbereitschaft mag dabei durchaus eine entscheidende Rolle spielen, da durchgeführte Isolierungsversuche mit Hasenfettgewebe aus dem Nierenlager selbst bei minimalster Kollagenasemenge und zartester Behandlung zu nahezu völliger Zellzerstörung geführt haben.

Die nun nach der Isolierung vorliegende Fettzellsuspension enthält noch die zugegebene Kollagenase, die jetzt nach der Isolierung entfernt werden muß, einmal um einer Zerstörung der Fettzellen entgegen zu wirken, zum andern um eine Inaktivierung der in der folgenden Inkubation zugesetzten Hormone zu vermeiden. Zu diesem Zweck läßt man die Fettzellen in Polyäthylenröhrchen sich an der Oberfläche der Flüssigkeitssäule absetzen. - Bei der ganzen Verarbeitung und Inkubation der Fettzellen wird kein Glasmaterial verwendet, um nicht ein Anliegen der Zellen an der Glaswand und dadurch deren Zerstörung zu bewirken. - Haben sich die Fettzellen ihrem Auftrieb

folgend abgesetzt, so wird die darunter befindliche Kollagenaselösung abgesaugt, die gleiche Menge frischen Puffers zugegeben und das Röhrchen aufgeschüttelt, um zwischen den Zellen befindliche Kollagenase dort zu entfernen und in Lösung zu bringen. Um das Absetzen der Zellen an der Oberfläche zu beschleunigen,wird das Röhrchen mit ca. 200 - 300 U/min zentrifugiert; bei dieser Geschwindigkeit gehen im allgemeinen keine Zellen kaputt (Ausnahmen s.o.). Diese Drehzahl ist bedeutend geringer als die, die bei Rattenfettzellen angewendet wird - Rattenfettzellsuspension ca. 800 U/min. Diese hohe Drehzahl vertragen die Rattenfettzellen anstandslos. Vorteilhaft bei dieser hohen Beschleunigung ist, daß sich die Zellen - auch die kleinsten (insgesamt sind die Rattenfettzellen kleiner als die menschlichen - s.u.) - schnell absetzen und der darunterstehende Puffer klar ist. Schwieriger liegt das Problem bei den menschlichen Fettzellen. Einmal darf man, um die Zellen intakt zu erhalten, nicht einmal halb so schnell zentrifugieren, zum anderen soll der gesamte Auswaschvorgang relativ schnell ablaufen, um die Zellen nicht unnötiger Beantspruchung wie Abkühlung und Herumstehen auszusetzen. Das Problem ist nun folgendes: Die menschlichen Fettzellen in einer Suspension haben nicht wie z.B. die Rattenfettzellen mehr oder weniger dieselbe Größe, sondern sehr schwankende Zellgröße von sehr kleinen Zellen (wesentlich kleiner als die Rattenfettzellen) bis sehr großen Zellen. Bei sachter Zentrifugation werden nun die großen Zellen mit ihrem relativ starken Auftrieb sich zuerst an der Oberfläche absetzen und je kleiner die Zellen werden, um so langsamer werden sie im Puffer aufsteigen. D.h. praktisch: wird die Fettzellsuspension nur sehr kurz bei 300 U/min zentrifugiert, bekommt man eine überstehende Zellschicht vorwiegend aus grossen Zellen; wird jetzt der unterstehende Puffer abgesaugt - er sieht noch trüb aus, auch wenn schon die ganze Kollagenase ausgewaschen ist - , entfernt man die kleinen Zellen mit dem

dem Puffer. Diese unvorsichtige Handhabung beeinflußt wesentlich die spätere Stoffwechseluntersuchung, da nur noch die selektierte Fettzellmenge reagieren kann. Der Klärung des Puffers muß also große Aufmerksamkeit geschenkt werden. Eine Trübung des Puffers kann allerdings auch dann entstehen, wenn viele Zellen zerbrochen sind und der Zellrest ohne das abgetrennte Triglycerid in der Lösung schwimmt; diese Reste besitzen praktisch keinen Auftrieb und lassen sich bei dieser niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeit auch nicht als Sediment abtrennen. Diese Trübung trat bei den oben erwähnten Zellisolierungen aus Hasenfettgewebe augenfällig in Erscheinung. Dieses Auswaschen wird nun zur Entfernung der Kollagenase und des Zellbruchs viermal ausgeführt und dann die Suspension mit Albuminpuffer aufgefüllt, jenachdem wieviel Aufschwemmung benötigt wird.

2.3. I N K U B A T I O N

Inkubiert wurde in zwei verschiedenen Inkubationsansätzen. Einmal wurde der Inkubationslösung ^{14}C-Glucose zugegeben; durch die Stoffwechselaktivität der Zellen wird die Glucose abgebaut und aus dem vollständig abgebauten Substrat $^{14}CO_2$ gebildet, das dann in einem Packard-Szintillationszähler gemessen wurde.
Zum andern wurde ohne radioaktive Substanz gearbeitet und die Lipolyse anhand des freigesetzten Glycerins gemessen.

2.3.1. C - 14 - G L U C O S E

Noch während der Kollagenaseinkubation des Fettgewebes wurden Packardgefäße mit den nötigen Puffern und Lösungen ver-

sehen, so daß nach dem Auswaschen der Kollagenase die Fettzellsuspension sofort in die Reaktionsgefäße pipettiert werden konnte. Von besonderer Bedeutung ist dabei, daß man die Fettzellsuspension nach jeder Probenentnahme erneut aufschütteln muß, um eine gleichmäßige Verteilung der Fettzellen im Puffer zu erreichen, da diese sich schnell entmischen. Mit demselben Reaktionsgemisch wurde jeweils eine Doppelprobe beschickt. Dieses Gemisch enthielt einen Milliliter Schilddrüsenhormonverdünnung bzw. nur Puffer und einen Milliliter Insulinlösung bzw. ebenfalls nur Puffer - dazu kam dann noch ein Milliliter Fettzellsuspension.

Die C-14-Glucose befand sich in den jeweiligen Insulinverdünnungen. Der bisher verwendete Puffer, sowohl als Lösungsmittel wie rein verwendet, war Albuminpuffer, der 2 g% Albumin und 10 mg% Glucose enthielt (genauer Ansatz siehe unten). 10 mg% Glucose wurde von Gliemann(67) [19] bei einer Vergleichsuntersuchung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen als die günstigste Konzentration gefunden (Abb. 1); diese Konzentration wurde auch hier beibehalten.

Die Reaktionsinkubation wird nun wie die Kollagenaseinkubation in dem Schüttelgerät bei 37 °C vorgenommen. Nach 90 min Inkubation werden die Gefäße herausgenommen. Freigesetztes $^{14}CO_2$ befindet sich jetzt also im Gas über dem Inkubationsmedium oder physikalisch gelöst in der Flüßigkeit selbst. Der Abbruch der Reaktion und das Austreiben des gelösten CO_2 wird durch Zugabe von 8n Schwefelsäure erreicht: einmal werden dadurch die Zellen zerstört und zweitens wird die schwache Säure ausgetrieben. Dieses Packardgefäß mit der gestoppten Reaktion wird über eine Schlauchverbindung mit einem zweiten verbunden (Abb. 2). In diesem zweiten Gefäß befindet sich ein gefalteter Streifen Chromatographiepapier, der mit Hyamin getränkt ist. Dieses Hyamin bindet CO_2 . Die Gefäß-

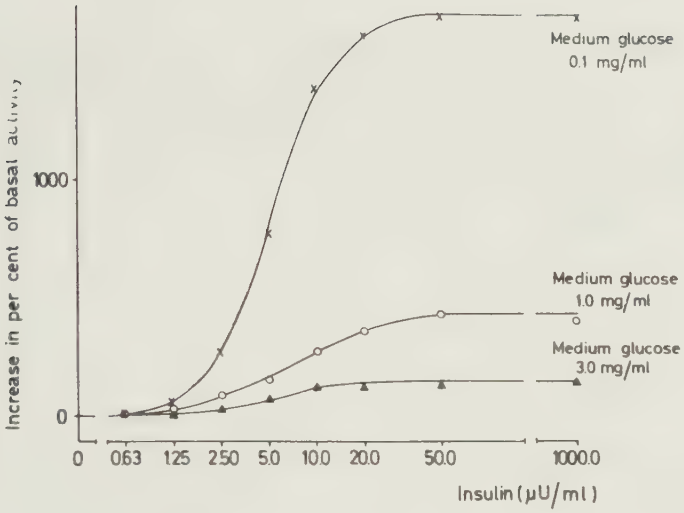


Abb. 1 : Untersuchung mit versch. Glucosekonz. (Gliemann[19])

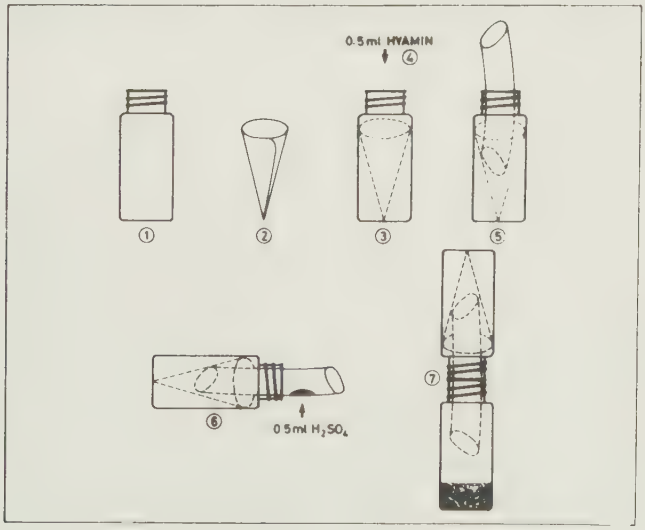


Abb. 2 : Schlauchverbindung der zwei Packardgefäße

verbindung wurde in einem Kühlraum bei 4 °C 90 min geschüttelt, um alles CO_2 quantitativ zu binden. Nach der Trennung der Gefäße wurde jenes mit dem Chromatographiepapier mit Scintillationsflüßigkeit aufgefüllt, verschlossen, und die Strahlung im Packardzähler registriert. Die Zählzeit betrug 10 min je Probe.

2.3.2. L I P O L Y S E

Der oben geschilderte Ansatz wurde auch zur Bestimmung der Lipolyse verwendet, selbstverständlich ohne Zusatz von C - 14 -Glucose, jedoch in Anwesenheit von 10 mg% nicht markierter Glucose. Nach den 90 min Inkubation wurde die Inkubationslösung in kleine Polyäthylenröhrchen abgefüllt und - nachdem sich die Zellen wieder abgesetzt hatten - der zellfreie Puffer, der das freigesetzte Glycerin enthält, mit einer langen Kanüle vorsichtig entfernt um keine Zellen mitzunehmen. Der entfernte Puffer wurde der Glycerinbestimmung zugeführt.

Anmerkung zur Insulinverdünnung

Zu den Probengefäßen mit Fettzellsuspension liefen immer noch Gefäße mit, die dieselben Hormonlösungen enthielten wie die Proben, aber statt mit Zellsuspension nur mit Albuminpuffer beschickt waren. Die Messwerte aus diesen Proben ergaben im Mittel einen Leerwert, der von dem effektiven Probenwert subtrahiert wurde. Dabei mußten alle Leerwertproben mehr oder weniger denselben Messwert aufweisen. Befindet sich nun ein stoffwechselndes Substrat in der Inkubationslösung, so kommt es zu einer CO_2-Produktion, die das von den

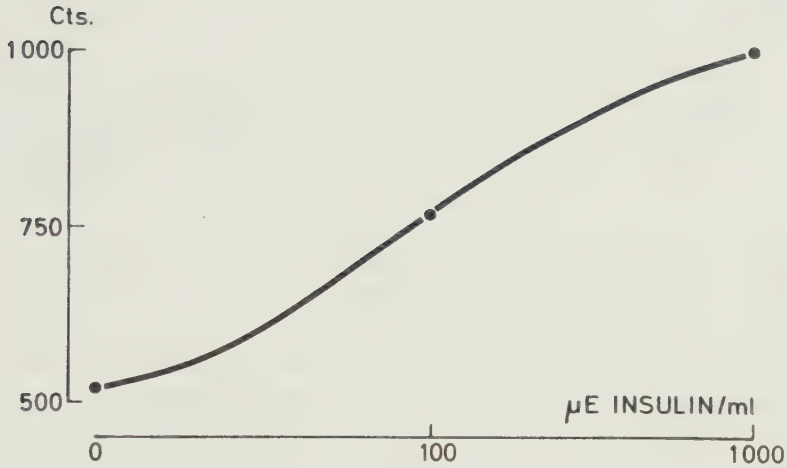


Abb. 3: CO_2-Produktion von Mikroorganismen

Zellen produzierte Kohlendioxid weit übersteigt und eine starke Insulinabhängigkeit zeigt. Urheber dieser Stoffwechselaktivität (Abb. 3) sind Pilze, Bakterien o.ä. (Da als Parameter die CO_2-Produktion verändert wird, ist hauptsächlich die $^{14}CO_2$-Messung gestört).

Um die Ansiedlung dieser Mikroorganismen zu erklären, muß ich näher auf die Insulinverdünnung eingehen. Ausgangssubstanzen und Lösungen sind kristallines Insulin, n/200 HCl, Gelatinelösung 10 %ig und Albuminpuffer. Ursprünglich wurde nun zu jedem Versuch die Insulinverdünnung neu angesetzt. Die 10 g%ige Gelatinelösung wurde im Kühlschrank aufbewahrt und ist dort geliert, so daß sie zu jedem Versuch wieder verflüssigt werden mußte. Diese Lösung diente nun den Mikroorganis-

men als Nährboden und sie bildeten Kolonien, die, im Entstehen begriffen, nicht zu sehen waren und in die Insulinverdünnung mit eingeschleppt wurden.

Um dieser Gefahr aus dem Wege zu gehen, muß man entweder die Gelatinelösung zu jedem Versuch neu aus amorpher Gelatine herstellen oder, wie es hier praktiziert wurde, aus frisch angesetzter Gelatinelösung die Insulinverdünnung für mehrere Versuche im voraus ansetzen, in einzelne Proben aufteilen und einfrieren und dann erst vor Verwendung wieder auftauen. Taut jedoch eine Probe aus Versehen für längere Zeit auf, wird wieder eingefroren und später verwendet, so zeigt sich wieder diese Organismentätigkeit. Deswegen sind diese Leerwerte unbedingt von Nöten, um diesen Störfaktor auszuschalten, der rein meßtechnisch zwar nur bei der C-14-O_2-Bestimmung in Erscheinung tritt, durchaus aber auch einen Einfluß auf die Glycerinbestimmung haben kann, einmal vielleicht durch rapiden Glucoseverbrauch und zum andern durch eine mögliche Wechselwirkung von Hormon -hier also Insulin- und Mikroorganismen, dies insbesondere bei längerem Stehenlassen der aufgetauten Insulinverdünnung. Keine Nebenreaktion zeigt sich bei der $^{14}CO_2$-Bestimmung bei Proben, die erst zum Versuch aufgetaut werden. Bei dieser Verfahrensweise müßte man demnach auch keine Störung der Inkubation zur Glycerinmessung zu befürchten haben.

3.0. BEZUGSGRÖSSE DER ERGEBNISSE

Nach der $^{14}CO_2$-Bestimmung bzw. der Glycerinbestimmung kann für einen Versuch eine Aussage gemacht werden über differierende Hormonwirkungen auf die Stoffwechselleistung einer bestimmten Fettzellsuspension. Zum Vergleich mehrerer Versuche ist eine Bezugsgröße notwendig.

3.1. ZELLZAHL

Eine naheliegende Bezugsgröße ist, da ja isolierte Zellen vorliegen, die Zellzahl. Hierzu ist nötig die Zellzahl/ml der Fettzellsuspension zu kennen. Zu diesem Zweck dient eine Zählkammer, wie sie z.B. für Blut-, Liquor- etc. Untersuchungen Verwendung findet. Wir benutzten eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die geeichte Zählkammer wird mit frisch aufgeschüttelter Fettzellsuspension beschickt, die Zellen ausgezählt und daraus die Milliliteranzahl ausgerechnet. Dabei wird die Zellgröße nicht berücksichtigt. Diese ist bei Rattenfettzellen nach Literaturangaben [17] mehr oder weniger gleich groß, weist aber nach eigenen Untersuchungen doch auch erhebliche Schwankungen auf; doch kann man meistens alle Zellen auszählen. So läßt sich ein vergleichbarer Quotient Messergebnis/Zellzahl aufstellen. Diese Methode wurde lange Zeit für Rattenfettzellen angewandt, ist aber nicht durchführbar bei menschlichen Fettzellen. Das Gros der menschlichen Fettzellen ist größer als die Rattenfettzellen. Beschickt man nun den Zählspalt der Zählkammer von der Seite her, so werden die Zellen auf Grund von Oberflächenhaftung abgebremst, der Puffer breitet sich schneller aus und läßt die Zellen zurück. So kommt eine ungleichmäßige Vertei-

lung der Fettzellen in der Zählkammer zustande, am Ort der Zugabe dicht liegende Zellen, weit davon entfernt nur vereinzelt Zellen. Unter diesen Bedingungen ist die Zählkammer nicht zu verwenden.

Bei der Zählkammer ist das Flüßigkeitsvolumen, das ausgezählt wird, durch den Abstand des Deckglases von der Trägerplatte gegeben. Eine andere Möglichkeit wäre nun ein bestimmtes Volumen z.B. einen Tropfen Zellsuspension bekannten Volumens vorzugeben und dann den gesamten Tropfen auszuzählen. Zu diesem Zweck wird auf einen Objektträger ein Vaselinering aufgetragen, in diesen Ring 5 µl Fettzellsuspension gegeben und diese mit einem Deckglas abgedeckt so, daß das Deckglas der Vaseline aufliegt, die Zählkammer abdichtet und dadurch, daß es in Kontakt mit dem Tropfen kommt, diesen ausbreitet. Zählt man jetzt die Zellen im Tropfen, kann man diese auf das eingegebene Volumen beziehen und hat so wieder eine Vergleichsgrundlage. Die Schwierigkeit hierbei liegt nun im Auszählen der Zellen. Einmal ist es schwierig die Zellen auszuzählen, wenn diese sehr dicht geträngt liegen. Liegen sie in größeren Einzellabständen sind sie gut zu zählen und zu differenzieren auch im ungefärbten Nativpräparat. Dies geht aber nur unter der Voraussetzung, daß die Zellen insgesamt und alle zusammen relativ groß sind - und dies ist bei den menschlichen Fettzellen nur sehr selten der Fall. Dabei ist es schon schwierig kleine gesehene Elemente als Fettzellen zu differenzieren, wenngleich die Fettzellen sich ansonsten gut von z.B. Fettropfen unterscheiden lassen. Sie zeichnen sich im mikroskopischen Bild aus durch ihre immer runde Form und einen ausgeprägten dunklen Randwall,während die erwähnten Fettropfen durch Zusammenfließen relativ groß sind, eine inhomogene Form aufweisen und nicht den charakterischen dunklen Ring besitzen. Bei den angesprochen kleinen Zellelementen kommen die Zellcharakteristika allein der Kleine wegen nicht mehr so ausgeprägt zur Geltung

und selbst bei Nativfärbung mit z.B. Löfflers Methylenblau läßt sich selbst bei größter Vergrößerung mit Immersion nicht eindeutig der Zellnachweis führen. Bei gehäuftem Auftreten dieser kleinen Elemente ist es sowieso nahezu unmöglich diese auszuzählen. So ergibt sich, daß die Zellzahl als Bezugsgröße eine sehr ungenaue Vergleichszahl darstellt.

3.2. DNA, INDEX DNA / TRIGLYCERID-GEHALT

Die großen und kleinen Zellen unterscheiden sich im wesentlichen durch ihre gespeicherte Triglyceridmenge, während die funktionellen Bestandteile in etwa dieselben Mengenrelation von Zelle zu Zelle aufweisen. Eine meßbare Größe davon ist die DNA-Menge des Zellkerns. So wurde nach einer Möglichkeit gesucht die DNA aus den Zellen zu isolieren und zu bestimmen. Die Relationsgröße nimmt dann Abstand von der Zahl der Einzelelemente und bezieht sich auf eine Gewichtseinheit DNA, die - bei gleicher DNA-Menge pro Zelle - in Relation zur Zellzahl steht. Dabei wäre vorteilhaft bei der DNA-Isolierung gleichzeitig das gespeicherte Triglycerid zu isolieren und zu bestimmen, um über den Quotienten DNA/Triglycerid eine relative Aussage über das mittlere Zellvolumen machen zu können. Eine Ausmessung [20] der Zellen und Berechnung des mittleren Zellvolumens scheidet außer der Schwierigkeit bei der Zellzählung und Ausmessung noch auf Grund der schwer möglichen Koordination der verschiedenen Versuchs- und Arbeitsgänge aus.

3.2.1. DNA - BESTIMMUNG

Die gängigste Methode aus einem Gewebe Einzelfraktionen zu isolieren ist wohl die Homogenisation und anschließend die fraktionierte Zentrifugation [21-23]. Abgesehen von dem apparativen und zeitlichen Aufwand dürfte es dabei Schwierigkeiten bereiten die Triglyceride quantitativ abzusondern. Diesem Bestreben kommt ein zweiphasiges Lösungsmittel, bei dem sich in einer Phase (z.B. Chloroform) nur die Triglyceride selektiv lösen, die andere Phase (wässerig) die überigen Zellbestandteile enthält, am besten entgegen.

Dem zugute kommt, daß kein Gewebe sondern isolierte Zellen vorliegen, die bei kräftiger mechanischer Alteration leicht zu zerstören sind. So kann man bei scharfer Zentrifugation der Fettzellsuspension alle Zellen zerstören und im unterschichteten Chloroform die Triglyceride herauslösen. In idealer Weise kommt den zu fordernden Bedingungen die DNA-Isolierung nach Marmur [24,25] entgegen.

Den Anweisungen von Marmur folgend wird die mechanische Zellzerstörung durch Zentrifugation noch durch chemische Zellysis durch Zugabe eines Detergens unterstützt (Na-Laurylsulfat = Dodecylhydrogensulfat Na-Salz). Dies hat zudem die Aufgabe vorhandene und freigesetzte Enzyme zu inaktivieren, die die freigesetzten DNA-Komplexe zerstören könnten. Um überhaupt einer DNAase-Aktivität vorzubeugen wird bei der vorgegebenen Fettzellsuspension das Suspensionmedium geändert. Zur Reaktionsinkubation liegen die Zellen in Albuminpuffer suspendiert vor, zur DNA-Isolierung wird dieser Puffer entfernt und stattdessen Saline-EDTA-Lösung verwendet.

Die Detergenszugabe bewirkt ferner eine Denaturierung der Pro-

teine der Zellpartikel. Da die DNA an Proteine gebunden ist, muß der Zellzerstörung die Trennung der DNA von den Proteinträgern folgen. Diese Proteindenaturierung wird schon bei der Zellzerstörung begonnen und wird durch Zugabe von Chloroform weitergeführt, das eine Oberflächendenaturierung der Proteine bewirkt. Gleichzeitig erfolgt durch Na-perchlorat eine Trennung von Protein und DNA.

Nun liegt in der wässerigen Phase außer der DNA noch das denaturierte Protein vor. Dieses wird durch Zentrifugation entfernt. Es bildet sich dabei eine Trennschicht aus Protein zwischen der wässerigen Phase und der Chloroformphase. Der Entmischung der wässerigen Phase bei der Zentrifugation und zu einer Stabilisierung der Trennschicht soll Isoamylalkohol beitragen. Gleichzeitig soll dieser Alkohol ein Schäumen der wasserigen Phase verhindern, was durch die Detergentienzugabe bewirkt werden könnte.

Nach dieser Prozedur wird die Chloroformphase abgetrennt und gesammelt. Aus der wässerigen DNA-Lösung wird die DNA durch Zugabe von Äthanol ausgefällt und durch Zentrifugation als Sediment abgetrennt. Nach Entfernung der Flüßigkeit liegt die DNA als Trockensubstanz vor.

Zur DNA-Bestimmung bieten sich verschiedene Methoden an. Schmidt-Thannhauser [26] beschreibt eine Methode, die über die Bestimmung des Phosphorgehaltes der DNA eine Aussage über die DNA-Menge macht. Die grundsätzlich andere Quantifizierungsmethode [27] beschäftigt sich mit der Bestimmung der Zucker in der DNA. Bei dieser Zuckerbestimmung unterscheidet man drei verschiedene Bestimmungstypen. Einmal kann eine Aldehydreaktion ausgeführt werden. Diese baut darauf auf, daß 2-deoxy-Pentose überwiegend als Aldehyd vorliegt. Eine zweite Bestimmungsmethode beruht auf der Reaktion verschiedener Reagentien mit Hydroxy- und Ketoaldehyden. Die dritte Möglichkeit be-

steht in der Bestimmung von Furanderivaten, die aus Saccharide gebildet werden.

Die erste dieser Möglichkeiten zur Zuckerbestimmung wird bei der Bestimmung mit Diphenylamin [27-30] ausgenützt. Die Bestimmung mit Indol [27,31,32] läuft auf eine Reaktion von Hydroxy- und Ketoaldehyden hinaus.

Für die Auswahl von besonderer Bedeutung war neben Spezifität der Reaktion insbesondere deren Empfindlichkeit, da die zur Messung überbleibende Fettzellsuspension nur ein beschränktes Quantum darstellt, das nicht nach Belieben erweitert werden kann, um die die zu messende DNA-Menge zu vergrößern. Für die viel angewendete Diphenylaminmethode ist von Steel [28] eine Mikromethode angegeben, die eine Bestimmung bis zu 0,6 µg DNA/ml zuläßt. Allerdings ist diese Modifikation nur mit einer Spezialapparatur ausführbar, die hier nicht verwendbar ist. Der Meßbereich der normalen Diphenylaminmethode beginnt etwa bei 25 µg DNA/ml. Die Diphenylaminmethode wird an Empfindlichkeit übertroffen durch die von Ceriotti [31] modifizierte Methode mit Indol. Ceriotti gibt einen Meßbereich von (2,5)-5-15 µg/ml an. Dische [27] beschreibt eine noch größere Empfindlichkeit, die auch DNA-Konzentrationen unter 1,6,µg/ml noch erfaßt. Diese Bestimmung nach Ceriotti schließt sich elegant an die DNA-Isolierung nach Marmur an, da ebenfalls mit einer Chloroformphase gearbeitet wird und eventuell mit der DNA ausgefälltes Protein jetzt noch zur Abscheidung kommt.

Was die Spezifität betrifft, so geben etliche Zucker mit Indol eine Farbreaktion. Diese Tönung läßt sich jedoch mit Chloroform extrahieren. Allein die Farbreaktion mit Arabinose, so diese vorhanden, läßt sich nicht auswaschen, beträgt aber nach Ceriotti nur 8% der Farbreaktion mit DNA.

Gelöst wird die ausgefällte DNA nach Angabe von Marmur [24,25] in Sodium-Saline-Citrat-Puffer. Dabei wird die ausgefällte DNA erst in verdünntem Puffer aufgenommen, der nach Lösung der DNA durch konzentrierten SSC-Puffer auf die vorgeschriebene Konzentration gebracht wird. Gelöst wird die DNA in verdünntem SSC-Puffer, da sie in normal konzentrierten Puffer schwerer löslich ist. Außer Stabilisierung des wiedergelösten DNA bewirkt der SSC-Puffer eine Chelatbindung zweiwertiger Jonen. Ausführung der DNA-Bestimmung siehe unter 5.2. .

3.2.2. TRIGLYCERIDBESTIMMUNG

Das aus den Zellen freigesetzte Triglycerid wird, wie oben erwähnt, in der Chloroformphase erhalten. Die Triglyceridbestimmung läuft auf eine Glycerinbestimmung hinaus. Ehe die Triglyceride gespalten werden, muß die Chloroformlösung noch soweit verdünnt werden, daß die später gemessene Glycerinkonzentration in den Messbereich der enzymatischen Bestimmungsmethode fällt. Die Spaltung der Triglyceride erfolgt mit äthanolischer Kalilauge [33,34] . Ausführung siehe unter 5.3. .

4.0 AUSFÜHRUNG DER TECHNIK

In diesem und im folgenden Abschnitt (5.) soll die praktische Versuchsausführung beschrieben werden, nachdem in den Abschnitten 2. und 3. vor allem auf die besonderen Schwierigkeiten der Technik eingegangen wurde und verschiedene Techniken verlichen wurden.

4.1. ISOLIERUNG

Lösungsmittel und flüßiges Medium ist im gesamten Versuchsablauf zumeist Albuminpuffer. Deshalb möchte ich zuerst dessen Zusammensetzung beschreiben. Der Albuminpuffer besteht aus 10 mg% Glucose und 2 g% Albumin. Verwendet wurde Serumalbumin vom Rind reinst von den Behringwerken. Die Glucosekonzentration ergab sich wie beschrieben aus den Untersuchungen von Gliemann [19]. Lösungsmittel des Albuminpuffers ist Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer. Dieser besteht aus einer 20 Vol.% Stocklösung, von der 16 ml je 100 ml Ansatz verworfen werden und dafür 16 ml 1 g% Natriumhydrogenkarbonatlösung hinzugefügt werden. Die Stocklösung besteht aus 3,75 g% Kaliumchloridlösung, 6,75 g% Kaliumdihydrogenphosphatlösung, 19,1 g% Magnesiumsulfatlösung, einer 6,1 g% Calciumchloridlösung und ferner aus Natriumchlorid. Das Mischungsverhältnis der einzelnen wässerigen Lösungen und des Salzes sind: 4 Vol.% KCl-Lösung, 1 Vol.% KH_2PO_4-Lösung, 1 Vol.% $MgSO_4$-Lösung, 3 Vol.% $CaCl_2$-Lösung und ferner 4,5 g% NaCl. Verdünnungsflüßigkeit ist wieder Wasser. Das Vorhandensein von Ca-Jonen ist von besonderer Wichtigkeit für die Aktivierung der Kollagenase [35].

Transportiert wird das Fettgewebe in einem Packardgefäß mit etwa 2,5 ml Albuminpuffer, das sich in einem Dewargefäß bei einer Wassertemperatur von ungefähr 37 °C befindet. Zur Isolierung der Fettzellen wird die Kollagenaselösung in einem Packardgefäß angesetzt. Dabei beträgt die Kollagenasekonzentration 1000 U/ml, Lösungsmittel ist Albuminpuffer - die in der meisten Literatur angegebene Kollagenasekonzentrationsangabe in mg% halte ich für unfunktionell, da die Kollagenase je nach Charge eine andere Enzymaktivität besitzt und ja wohl diese ein Maß für die Isolierungspotenz darstellt und nicht die nichts aussagende mg-Angabe. Angesetzt werden von der Kollagenaselösung in dem Packardgefäß 4 ml. In dieses werden nun insgesamt 6-8 g Fettbröckelchen hineingeschnitten. Die Größe der Bröckelchen beträgt dabei wie schon geschrieben etwa Linsen bis Erbsengröße. Zum Zerschneiden wurde das Fettgewebe in eine kleine Petrischale mit Albuminpuffer gegeben. Die abgeschnitten Bröckchen Fett wurden kurz auf Fließpapier o.ä. abgetrocknet, um beim Abwiegen des Fettes möglichst wenig mitgenommen Albuminpuffer mitzuwiegen. Gewogen wird das Fett in der Kollagenaselösung. Vor der Inkubation wird die Lösung mit den Fettbröckelchen noch mit Carbogen begast. Die positive Wirkung auf die Isolierung erscheint allerdings fraglich. Jedenfalls ging die Isolierung genausogut oder so schlecht vonstatten, ob der Ansatz nun vor der Inkubation begast wurde oder nicht. Inkubiert wird 60 min bei 37 °C im Köttermannschüttler.

Nach der Inkubation werden die angedauten Fettbröckelchen in eine Doppellage Mullbinde gegeben, die vorher in ein Polyröhrchen 21,5 x 100 als Filter gesteckt wurde. Die Zellen lassen sich nun mit leichtem Druck aus ihrem Zellverband lösen und passieren das Mullbindenfilter.

Zum Auswaschen der Kollagenase wird zu der Fettzellsuspension

im Polyröhrchen 8 ml Albuminpuffer gegeben. Dann wird das Röhrchen von Hand so geschüttelt, daß die Zellen gleichmäßig verteilt werden. Daraufhin wird das Röhrchen bei ca. 300 U/min etwa 45 sec lang zentrifugiert. Die sich dabei oben absetzende Zellschicht wird durchstoßen und die sich darunter befindliche Flüßigkeit entnommen und verworfen. Nun wird die Fettzellsuspension mit derselben Menge Albuminpuffer, wie eben entnommen wurde, wieder aufgefüllt, dann das Glas wieder geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird noch dreimal wiederholt. Nach der letzten Zugabe von Albuminpuffer wird die Suspension noch einmal durch eine Doppellage Mullbinde gegeben, um noch letzte Rückstände zu entfernen. Jetzt kann die Suspension noch mit Albuminpuffer bis zur gewünschten Menge aufgefüllt werden.

4.2.0. INKUBATIONANSÄTZE

Je 1 ml dieser Fettzellsuspension wird nun zu den Inkubationsansätzen gegeben. Diese bestehen aus 1 ml Insulinverdünnung und 1 ml Schilddrüsenhormonverdünnung. In jedem Inkubationsgefäß - wieder Packardgefäße - befindet sich also 3 ml Flüßigkeit.

Auf die Insulinverdünnung wurde schon eingegangen. Verwendet wurde kristallines Insulin vom Rind oder Schwein von der Farbwerken Hoechst oder von Novo Industrie GmbH. Von diesem kristallinen Insulin wird eine Stammlösung hergestellt mit einer Konzentration von 10 IE/ml. Als Lösungsmittel dient n/200 HCl. Der Gelatinepuffer zur weiteren Verdünnung setzt sich aus 2,2 Vol.% der erwähnten 10 g%-igen Gelatinelösung und 20 Vol.% Stocklösung zusammen. Verdünnungsmittel ist wieder Wasser.

Aus dieser Verdünnung werden 16 ml je 100 ml verworfen und dafür 16 ml $NaHCO_3$-Lösung hinzugefügt (Ansatz siehe oben). Die Insulinstammlösung wird nun successive mit Gelatine puffer verdünnt, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Dabei muß die Konzentration dieser Verdünnung das 75-fache der effektiven Konzentration im Inkubationsgemisch betragen, da die Insulinverdünnung im Gelatinepuffer noch mit Albuminpuffer endverdünnt wird; dabei kommt auf 4 ml Gelatinepufferverdünnung 100 ml Albuminpuffer (bzw. C-14 Albuminpuffer, s.u.). Die Endverdünnung erfährt dann bei Zugabe in den Inkubationsansatz noch eine weitere Verdünnung, da 1 ml Insulinverdünnung zu 2 ml Flüßigkeit gegeben werden.

Die Schilddrüsenhormonverdünnungen werden ebenfalls aus kristalliner Grundsubstanz hergestellt, die in Albuminpuffer gelöst wird. Verwendet wurde L-Trijodthyronin-Na und L-Thyroxin Na-Salz, beides Fa. Merck. Angesetzt wurde vom Trijodthyronin eine 15 x 10^{-6} M Lösung, das entspricht also in der Inkubation einer effektiven Konzentration von 5 x 10^{-6} M. Der Ansatz für Tetrajodthyronin betrug 75 x 10^{-6} M (also 25 x 10^{-6} M im Inkubationsgemisch).
Inkubiert wird 90 min im Köttermannschüttler bei 37 °C.

4.2.1.1. C - 14 - G L U C O S E

Soll die $^{14}CO_2$-Produktion bestimmt werden, so wird dem Albuminpuffer, mit dem die Insulinlösung endverdünnt wird, C-14-Glucose zugesetzt. Verwendet wurde D-Glucose-C 14 (U) der Fa. Amersham, die (die Glucose) aus Cannablättern, die in $^{14}CO_2$-haltiger Atmosphäre wuchsen, extrahiert wurde. Dabei ist unbekannt, welches C-Atom im Glucosemolekül markiert ist.

Die gefriergetrocknete Glucose wird mit Wasser verdünnt bis zu einer Aktivität von 100 µCi/ml. Der daraus angesetzte ^{14}C-Glucose-haltige Albuminpuffer enthält 0,16 ml dieser Verdünnung auf 100 ml Albuminpuffer.

Methodisch sauberer ist es wohl die teurere D-Glucose-1-C 14 zu verwenden, bei der im Molekül das C_1-Atom markiert ist. Diese Glucose wird hergestellt durch eine Kondensation von D-Arabinose und Cyanid-C 14.
Bei früheren Untersuchungen ergab sich allerdings kein wesentlicher quantitativer Unterschied zwischen U- und C_1-markierter Glucose.

4.2.1.2. C - 14 O_2 MESSUNG

Um das von den Zellen produzierte CO_2 aufzufangen, werden Packardgefäße mit einem gefalteten Blatt Chromatographiepapier Whatman 1 (Zuschnitt 90 mm x 42 mm) versehen und das Papier in dem Gefäß gespreizt. Daraufhin wird zur quantitativen Bindung des Kohlendioxids 0,5 ml Hyamin (Fa. Packard) auf das Papier pipettiert, in jedes Gefäß ein ca. 6-7 cm langes, schräg abgeschnittenes PVC-Schlauchstück eingeschoben und in diesen Schlauch des liegenden Packardgefäßes 0,5 ml 8n Schwefelsäure gegeben (siehe auch Abb. S. 9). Dabei darf das Chromatographiepapier nicht mit Säure benetzt werden, da dadurch die CO_2-Bindung beeinträchtigt wird. Nach den 90 min Inkubation werden die Reaktionsgefäße über die Schlauchverbindungen mit den vorbereiteten Gefäßen verbunden. Die im Schlauch sich befindende Säure läuft dabei in den Fettzellansatz. Diese Gefäßkombination (das Gefäß mit dem Fettzellansatz befindet sich unten) wird nun 90 min bei 4 °C geschüttelt. Daraufhin

werden die Gefäße getrennt. In jedes Gefäß mit Chromatographiepapier wird nun 10 ml Szintillationsflüßigkeit gegeben. Diese setzt sich zusammen aus 2,5 l Toluol, 0,5 l Äthanol abs., 7,5 g 2,5-Diphenyloxazol und 37,5 mg Dimethyl-POPOP. Diese jetzt zur Zählung vorbereiteten Proben werden im Packard-Szintillationszähler gemessen. Die Zählzeit je Probe beträgt 10 min.

4.2.2. L I P O L Y S E

Der Inkubationsansatz zur Lioplysebestimmung entspricht obigem Ansatz, nur eben ohne markierte Glucose. Nach der Inkubation wird der zellfreie Puffer gesammelt und darin sich befindliches Glycerin gemessen,das aus der intrazellulären Spaltung von Triglyceriden in freie Fettsäuren und Glycerin entstanden ist. Die Messung von FFS zur Bestimmung der Lipolyse ist nicht so vorteilhaft, da die FFS intrazellulär weiter verstoffwechselt werden können, während das einmal freigesetzte Glycerin fast quantitativ aus der Zelle abgegeben wird, da die Fettzellen nur minimale Konzentrationen von Glycerokinase enthalten [36] .

4.3. G L Y C E R I N B E S T I M M U N G

Die Glycerinbestimmung erfolgt im Prinzip nach der von Kreutz[37] beschriebenen enzymatischen Methode.
Aus Glycerin und ATP entstehen dabei Glycerin-1-P und ADP; als Enzym ist dabei Glycerokinase vonnöten. Mit dem ADP läuft die Reaktion nun weiter. Aus diesem und Phosphoenolpyruvat

entsteht unter der katalytischen Wirkung von Pyruvatkinase Pyruvat; das im ersten Schritt verbrauchte ATP wird hierbei wieder regeneriert. Das Pyruvat reagiert nun unter Zugabe von Lactatdehydrogenase zu Lactat. Bei diesem dritten Schritt ist noch die Zugabe von $NADPH_2$ als Energielieferant erforderlich. $NADPH_2$ wird dabei zu NADP reduziert. Und eben diese Reaktion dient zur Bestimmung des zugegebenen Glycerins, denn die oxydierte Form besitzt bei 340 nm einen charakteristischen Absorptionsgipfel, der der reduzierten Form fehlt. So wird also die Abnahme von $NADPH_2$ gemessen und in Relation gesetzt zur phosphorilierten Glycerinmenge.

Drei Ansätze werden zur Glycerinbestimmung benötigt: eine Pufferlösung und zwei Enzymlösungen. Die Pufferlösung besteht aus 5,6 g% Triaethanolaminhydrochlorid, 0,64 g% Natriumcarbonat und 10 g% Magnesiumsulfat gelöst in Wasser. Zur Enzymlösung 1 werden in 10 ml 5 g%iger Natriumhydrogencarbonatlösung 25mg Nicotinamidadenin-dinucleotid, 50 mg Phosphoenolpyruvat und 50 mg ATP gelöst. Die Enzymlösung 2 setzt sich zusammen aus 2 ml Pyruvatkinase (10 mg/ml), aus 0,35 ml LDH (10 mg/ml) und 0,35 ml Wasser.

Die praktische Ausführung erfolgt folgendermaßen: In eine 1 cm Cuvette werden 2,3 ml Pufferlösung, 0,2 ml Enzymlösung 1, 0,5 ml Probe und 0,03 ml Enzymlösung 2 gegeben. Nach der Vermischung wird der gerade Endlauf am Eppendorfschreiber abgewartet und der Extinctionswert E_1 abgelesen. Die Messung wird bei 334 nm ausgeführt. Mit dieser Messung wird also die zugegebene $NADPH_2$-Menge erfaßt. Jetzt wird zu den Proben 0,02 ml Glycerokinasesuspension gegeben, der oben beschriebene Reaktionsablauf kommt in Gang,und $NADPH_2$ wird reduziert. Wird jetzt bei 334 nm wieder der Endlauf abgewartet und die Extinction gemessen, so ist eine Abnahme der Extinction zu verzeichnen; der gemessene Extinctionswert sei E_2. Bildet man die Differenz

aus E_1 und E_2 , so ergibt sich über dieses ΔE die $NADPH_2$-Menge, die reduziert wurde. Die Reaktion, die diesen Reduktionsschritt bewirkt, wird nun nicht nur durch das in der Probe enthaltene Glycerin in Gang gesetzt, sondern auch durch Glycerinbeimengungen in der zuletzt zugesetzten Glycerokinase. Um diesen Fehler zu korrigieren muß man einen Leerwert - also statt Probe nur Puffer - mitlaufen lassen, dessen Extinctionsdifferenz E_L sein möge.
Die Extinction des über die Probe zugeführten Glycerins beträgt also $E = \Delta E - E_L$

Die Berechnung erfolgt nun nach folgender Formel :

E x 3,05 ml x Extinctionskoeffizient . Dieser Ausdruck gibt die Glycerinmenge (Mol) in der Cuvette, also in 3,05 ml Flüssigkeit an. Da das gesamte Glycerin aber über die 0,5 ml Probe eingebracht wurden, läßt sich ansetzen :

Konzentration in Probe =

= E x 3,05 ml x Ext.koeff. x 1/0,5 ml =

= E x 6,1 x Ext.koeff.

Bei dem einmal früher ermittelten Ext.koeff. für 334 nm von µg/6,09 ml ergibt sich die Benennung µg/ml.

5.1. ZELLZAHL

Die Möglichkeit die Zellzahl auszuzählen wurde bereits im Abschnitt 3.1. beschrieben. Aufgrund der dabei auftretenden Schwierigkeiten wurde von der Bestimmung der Zellzahl völlig abgesehen und nur die DNA-Bestimmung als Vergleichsgröße verwendet.

5.2. DNA-BESTIMMUNG

Zur DNA-Bestimmung wird die gesamte Fettzellsuspension verwendet, die nach dem Beschicken der Inkubationsgefäße übrig bleibt. Um mit der Bestimmung in den linearen Meßbereich der Methode (s.u.) zu kommen, ist eine möglichst große Fettzellsuspensionsmenge - und damit große DNA-Menge - vorteilhaft. Von dieser Fettzellsuspension, deren Volumen v sei, wird, nachdem sich die Zellen abgesetzt haben, der klare Puffer entfernt. Die zurückbleibende Fettzellschicht wird mit Saline-EDTA-Lösung auf 3 ml aufgefüllt. Dies ist eine wässerige Lösung von NaCl und EDTA (Titriplex III). Die Kochsalzlösung ist dabei 0,15 M, die EDTA-Lösung 0,1 M. Zu den 3 ml Fettzellsuspension werden jetzt noch 0,2 ml Natriumlaurylsulfatlösung 25 g%ig als Detergens hinzugefügt.

Dieser Ansatz wird nun hochtourig zentrifugiert um die Zellen mechanisch zu zerstören. Darauf folgt eine zehnminütige Inkubation bei 60 °C. Im folgenden Arbeitsgang wird nun der freigesetzte Triglyceridanteil der Zellen aus der wässerigen Phase entfernt. Dazu werden zu dem Ansatz 0,8 ml wässerige $NaClO_4$-Lösung 5 M und 4 ml eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (Mischungsverhältnis 24:1) hinzugefügt, und der neue

Ansatz 20 min in einem dreidimensionalen Schüttler geschüttelt. Nach dieser Prozedur und einer folgenden fünfminütigen Zentrifugation findet sich als Überstand die wässerige Lösung mit der freigesetzten und gelösten DNA, als Zwischenschicht die Zellwandreste und darunter die Chloroformphase mit den darin selektiv gelösten Triglyceriden. Die wässerige Phase wird in ihrer Gesamtheit der DNA-Bestimmung zugeführt. Das Volumen des entfernten und weiterverarbeiteten wässerigen Überstandes sei w . Zur Bestimmung der Triglyceridmenge wird die Chloroformphase gesammelt. Hierbei muß zur späteren Berechnung der Triglyceridmenge das gesamte nach der Zentrifugation vorhandene Chloroformvolumen registriert werden (Vol. sei c) - zur effektiven Bestimmung wird der Bruchteil eines Milliliters benötigt (s.u.), im Gegensatz zur DNA-Bestimmung, bei der die gesamte Lösung verwendet wird.

Die zu bestimmende DNA liegt nun also in wässeriger Lösung vor. Gibt man zu dieser etwa 15-20 ml 97 % bis absolutes Äthanol, so kann man damit die DNA ausfällen. Nach erfolgter Trübung, Ausfällung der DNA und Absetzen dieser im Glas wird dieses noch zentrifugiert und anschließend der Überstand abgegoßen. Das DNA-Sediment wird nun noch getrocknet. Zum Beispiel wird das Reagenzglas mit einem Korken oder Gummistopfen verschlossen, der mit zwei Kanülen durchstochen wird. Schließt man an eine davon über einen Schlauch eine Wasserstrahlpumpe an, so erzeugt man in dem Glas einen Unterdruck und durch den Luftstrom im Glas (Luftzufuhr über die zweite Kanüle) wird der verdunstete Alkohol rasch entfernt und die DNA getrocknet. Ein allzu brüskes Trocknen der DNA, indem man z.B. das Reagenzglas noch in ein warmes Wasserbad stellt, ist weniger vorteilhaft, da sich die dabei entstehenden DNA-Brocken nur mehr sehr schwer lösen lassen. Bei sanfter Trocknung bleibt das DNA-Sediment am Glas haften und wird mit SSC-Puffer wieder gelöst.

Dieser Sodium-Saline-Citrat-Puffer enthält NaCl (0,15 M - Lsg.) und Natriumcitrat (0,015 M - Lsg.) gelöst in Wasser. Der konzentrierte SSC-Puffer enthält die zehnfache Konzentration, der verdünnte ein Zehntel der Konzentration des beschriebenen SSC-Puffers. Zum Lösen der DNA wird der besseren Löslichkeit der DNA wegen vorteilhafterweise verdünnter SSC-Puffer (Marmur [24,25]) verwendet und dieser dann mit konzentriertem SSC-Puffer aufgefüllt, um die geforderte SSC-Pufferkonzentration zu erhalten.

Wie oben angegeben verhält sich:

verd. : SSC-Puffer : konz. = 1 : 10 : 100

x sei nun ml verdünnter SSC-Puffer und a sei das gewünschte Gesamtvolumen von SSC-Puffer; dann ergibt sich:

$$x + 100\,(a - x) = 10\,a$$

$$x - 100x = 10a - 100a$$

$$x = 90/99\,a = 10/11\,a \quad \text{d.h.}$$

um das Volumen a zu erhalten, muß man 10/11 a verdünnten SSC-Puffer und 1/10 a konz. SSC-Puffer zusammenschütten, um die geforderte SSC-Pufferkonzentration zu erhalten.

$$a = 10/11\,a \text{ verd.SSC} + 1/11\,a \text{ konz. SSC}$$

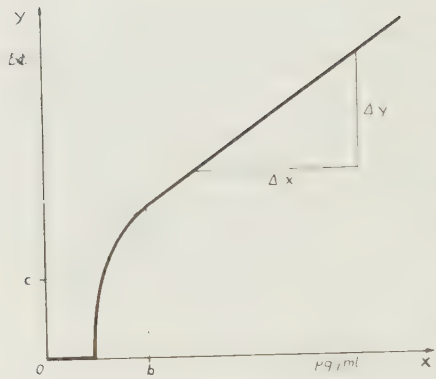
Zur DNA-Bestimmung wird das Sediment nun in 1 ml SSC-Puffer gelöst. Nach obiger Rechnung bedeutet dies, daß die DNA in

0,91 ml verdünntem SSC-Puffer gelöst wird und nach der Lösung noch 0,09 ml konzentrierter SSC-Puffer hinzugefügt wird. Als Färbereagens kommt 0,5 ml 0,04 % Indollösung und 0,5 ml konz. HCl hinzu. Die Probe und die Reagentien werden vermischt und zehn Minuten in einem kochendem Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung dieser wässerigen Lösung wird ihr 2,5 ml Chloroform zugegeben, um die chloroformlöslichen Farbstoffe auszuwaschen; in der wässerigen Lösung bleibt dann nur noch die DNA-Färbung erhalten. Dieses Auswaschen mit Chloroform wird dreimal ausgeführt. Nach jeder Chloroformzugabe wird das Gemisch aufgeschüttelt und dann zentrifugiert. Die überstehende wässerige Lösung wird abgenommen und in einem frischen Glas wieder mit Chloroform versetzt. Nach dem Auswaschen wird die gelbgefärbt Lösung im Photometer bei 492 nm in einer Mikrodurchlaufkuvette bei einer Blende 1 x 4 mit einem Leerwert aus Citratpuffer verglichen.

Gemessen wird die Extinktion: $E = E_{Probe} - E_{Leerw.}$

Dieser gefundene Extinktionswert muß nun einer DNA-Konzentration zugeordnet werden. Sei nun y = Extinktion und x = Konzentration, so ergibt sich der Differentialquotient dy/dx und der Schnittpunkt für $x = 0$ aus einer zugleich mit der Probe mitbestimmten DNA-Eichkurve.

Zur Herstellung der Eichlösung wurde DNA der Fa. SERVA verwendet. Angesetzt wurde eine Lösung von 100 µg DNA/ml. Gelöst wird die DNA nach obiger Rechnung in 10/11 a ml verd. SSC-Puffer, der dann mit 1/11 a ml konz. SSC-Puffer aufgefüllt wird. Diese Stammlösung kann in kleine Mengen aufgeteilt eingefroren werden. Zur Eichkurve werden die Verdünnungen 10 / 5 / 2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,3125 µg/ml, ja eventuell auch noch weiterere kleinerere Verdünnungen, verwendet. Daraus



$x \geq b$: $y = ax + c$

$y' = a = \frac{dy}{dx} = \frac{\Delta y}{\Delta x}$

Abb. 4 : DNA-Eichkurve

ergibt sich dann etwa folgende Eichkurve (Abb. 4). Über die aus dieser Eichkurve ermittelten Steigung der Geraden läßt sich der Probenextinktion eine DNA-Konzentration zuordnen. Die bestimmten Proben lagen allesamt im letzten Abschnitt der linearen Darstellung zwischen Extinktion und Konzentration. Die Extinktionswerte, für die nach der Kurve gilt $y = 0$ fallen in die Fehlerbreite des Photometers und ergeben so keine registrierbare Extinktion.

Die Berechnung der DNA-Konzentration in der Fettzellsuspension erfolgt so :

Es sei

x = DNA-Konzentration(µg/ml) in der gemessenen Probe

y = " in der Fettzellsuspension

v = Ausgangsvolumen (ml) der Fettzellsuspension

w = wässerige Phase (ml) nach Zentrifugation

vy = DNA (µg) in 3 ml Zellsuspension in Saline-EDTA

Daraus folgt, daß sich in der DNA-Ausfällung

$$\frac{v \cdot w \cdot y}{4 \text{ ml}} = \text{µg DNA befinden.}$$

(4 ml = 3 ml Zellsuspension + 0,2 ml Na-laurylsulfat +
+ 0,8 ml Natriumchloratlösung)

So ergibt sich, daß in der gemessenen Probe die Konzentration

$$x = \frac{v \cdot w \cdot y}{4 \text{ ml}^2}$$ vorliegt.

Die DNA-Konzentration in der Fettzellsuspension ergibt sich somit zu

$$y = \frac{4 \text{ ml}^2}{vw} \cdot x \qquad (\mu g/ml)$$

5.3. T R I G L Y C E R I D B E S T I M M U N G

Als letzter Punkt steht noch die Verarbeitung der Triglyceridlösung in Chloroform aus. Daraus sollte der Triglyceridgehalt der Fettzellsuspension bestimmt werden.
Wie unter 3.2.2. beschrieben, wird diese chloroformige Lösung zuerst noch verdünnt. Verdünnungsverhältnis:

1 : k (1 plus (k-1))

Dabei wählten wir bei unseren Bestimmungen den Faktor k = 64, um in den Messbereich der Bestimmung zu kommen.

Die folgende Triglyceridspaltung mit äthanolischer KOH wird folgendermaßen ausgeführt:
In eine 10 ml Zentrifugenglas wird zu 0,2 ml Triglyceridlösung 0,5 ml äthanolische KOH gegeben. Diese besteht aus 11,2 ml 25% KOH-Lösung, die mit Äthanol auf 100 ml aufge-

füllt wird. Dieses Zentrifugenglas nun wird mit einer Glaskugel abgedeckt und 30 min in einem Wasserbad bei 70 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Flüßigkeit in dem Glas entfernt, indem, wie bei der DNA-Trocknung, mittels einer Wasserstrahlpumpe ein Unterdruck im Glas erzeugt wird; die Gläser bleiben dabei im Wasserbad stehen. Der pulverige Rückstand wird sodann in 2,2 ml 1,684 g% Magnesiumsulfatlösung aufgenommen, die Mischung aufgeschüttelt und 15 min zentrifugiert. In dem Überstand wird dann wie schon beschrieben das Glycerin bestimmt. Bei der Triglyceridspaltung wurde die Probe um den Faktor 0,2/2,2 verdünnt (0,2 ml eingesetzte Glycerinlösung, Eintrocknung, Wiederlösung in 2,2 ml Magnesiumsulfat). Der gemessene Glycerinwert muß also mit dem Faktor 2,2/0,2 multipliziert werden.

Die Berechnung des Triglyceridgehaltes in der Fettzellsuspension erfolgt folgendermaßen:

x = gemessener Glycerinwert · 2,2/0,2 µMol/ml
y = Glyceringehalt in Fettzellsuspension µMol/ml
c = gesamte Chloroformphase
v = Ausgangsvolumen der Fettzellsuspension

Mit k als anfänglichen Chloroformverdünnungsfaktor ergibt sich dann :

kx = Konzentration (µMol/ml) in Chloroformphase
kxc = µMol Glycerin (Trigl.) in 3 ml Zellsuspension in Saline-EDTA

Für den Glyceringehalt (Triglyceridgehalt) in der Fettzellsuspension ergibt sich so

$$y = k \cdot c/v \cdot x \quad (\mu Mol/ml)$$

6.1. STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN INSULIN, T_3, T_4

Faßt man den bisher beschriebenen methodischen Teil zusammen, so schaffen wir der isolierten Zelle näherungsweise physiologische Bedingungen, da Albuminpuffer als Suspensionsmedium verwendet wird. In diesem wird die Zelle hormonalen Reizen ausgesetzt. Eine Aussage über den Stoffwechsel wird gemacht durch die Bestimmung von Stoffen, die von der Zelle ausgeschieden werden. Da das Hauptaugenmerk auf die Glucoseverwertung und den Triglyceridstoffwechsel gelegt wurde, bot sich als Parameter dafür einmal die CO_2-Messung an. Zur Bestimmung der Triglyceridspaltung und somit der Lipolyse wurde die freigesetzte Glycerinmenge bestimmt. Als Hormonzugabe bei allen Inkubationen wird Insulin in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Das Insulin bewirkt einmal einen lipogenetischen zum andern einen antilipolytischen Effekt. Als weitere Hormone wurden die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 verwendet.

Die Wirkung des Insulins ist nach Froesch [38] auch bei längerer Inkubation als konstant zu betrachten, so daß in den 90 min Inkubation ein konstantes Stoffwechselgeschehen abläuft, vorausgesetzt, die Stoffwechselpotenz der Zellen bleibt über die Inkubationszeit unverändert erhalten. Zumindest bleibt die Intaktheit der Zellen nach Lisch erhalten. Lisch [39] beschreibt ein Zerbrechen von etwa 15% der Zellen in der ersten halben Stunde und darauffolgend keine weitere Veränderung der Zellkonzentration.

6.2. ERGEBNISSE DER VORUNTERSUCHUNGEN

Ziel der Voruntersuchungen war es, überhaupt die Isolierung

der menschlichen Fettzellen in den Griff zu bekommen. Um eine Aussage über die Intaktheit und die Stoffwechselaktivität der isolierten Zellen zu finden, wurde die CO_2-Messung gewählt. Als Hormonzugabe wurden nur verschiedene Insulinkonzentrationen verwendet. Der Kurvenzug der CO_2-Produktion in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration zeigte bei den Versuchen mit epididymalen Rattenfettzellen einen charakteristischen Verlauf, so daß das Auftreten eines ähnlichen Reaktionsverhalten die Bestätigung für die Intaktheit der isolierten Zellen abgeben würde (Abb. 5). Verwendet wurde eine Insulinverdünnungsreihe mit den Insulinkonzentrationen 0, 100, 500 und 1000 µE/ml. Dabei ergibt sich bei den Rattenfettzellen meist ein Aktivitätsanstieg um etwa das Doppelte, wenn man die Probe 0 und 500 µE/ml vergleicht. Bei den menschlichen Fettzellen kommt man auf einen Aktivitätsanstieg um etwa das 1,2-fache beim Vergleich der Probe mit 0 und der mit 1000 µE/ml Insulin (Abb. 6). Vergleicht man die Fettmenge von Ratte und Mensch, die zur Isolierung kommt, so stehen 0,3 - 0,5 g bei der Ratte 6 - 8 g beim Menschen gegenüber. Vergleicht man die Zellzahl pro Inkubationslösung - bei den Voruntersuchungen war noch die Zellzahl die Vergleichsgröße - so ergaben sich bei den Rattenfettzellen durchschnittlich 150 000 Zellen/Inkubationsansatz, bei den Versuchen mit menschlichen Fettzellen 70 000 - 150 000 Zellen/Ansatz.

Auffällig ist dabei einmal die verwendete unphysiologische Insulinkonzentration. Diese ist aber auch von z.B. Salans [11] beschrieben worden, der mit 1000 µE/ml und sogar mit 10 000 µE/ml gearbeitet hat. Am meisten stört an diesen Ergebnissen der geringe Anstieg der CO_2-Produktion bei den menschlichen Fettzellen in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration. Das mag an der Zelle selbst liegen, daß sie nicht in dieser Weise auf Insulin anspricht wie die Rattenfettzelle. Man weiß auch, daß der Umsatz bei der Ratte besonders hoch ist.

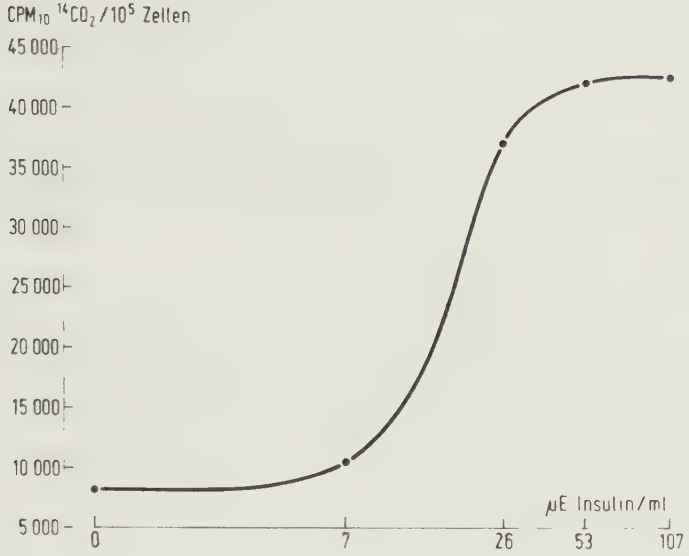


Abb. 5 : CO_2-Produktion bei Rattenfettzellen (aus Krick [13])

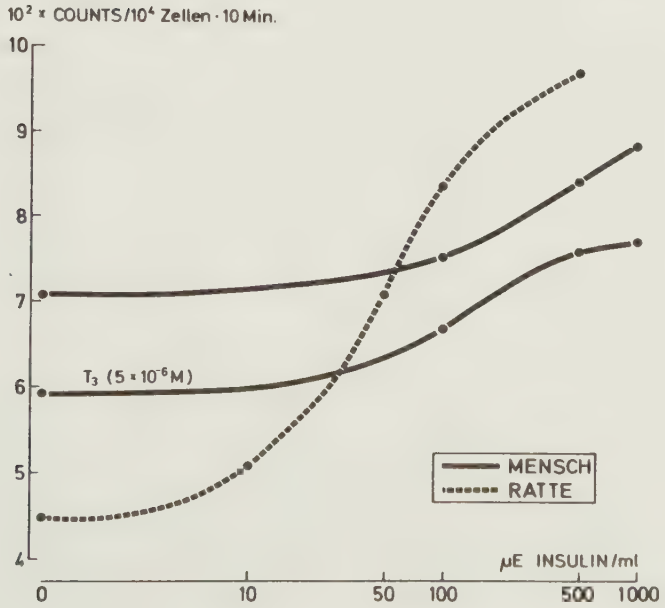


Abb. 6 : Vergleich Ratte/Mensch

Trotz der anfänglichen Schwierigkeiten sprachen die Zellen auf die Hormoneinflüße an und so konnte der eigentliche Versuch unternommen werden, als die Reproduzierbarkeit gewährleistet war.

7.1.1. KOLLEKTIV NORMALGEWICHTIG / ADIPÖS

Untersucht werden soll am menschlichen Fettgewebe, ob ein Unterschied besteht bezüglich der Stoffwechselaktivität zwischen dem Fett Normalgewichtiger und dem Adipöser. Zu diesem Zweck soll ein Kollektiv Adipöser einem Kollektiv Normalgewichtiger gegenübergestellt werden. Die Zellen jeder einzelnen Fettprobe werden dabei folgenden verschiedenen Reaktionsbedingungen ausgesetzt:

	./.		also ohne Schilddrüsenhormon und
0	50	500	nur mit den Insulinkonzentratio-
x	x	x	nen 0, 50, 500 µE/ml
	T_3		
0	50	500	zusätzlich T_3
x	x	x	
	T_4		
0	50	500	statt T_3 jetzt T_4
x	x	x	

So ergeben sich insgesamt neun verschiedene Reaktionsbedingungen. Da für jede Bedingung eine Doppelprobe angesetzt wird, ergeben sich also 18 Messungen/Fettzellsuspension. Die Konzentration 0 Insulin soll die Situation während einer Null-Diät darstellen. Physiologische Verhältnisse werden bei der Konzentration 50 µE/ml vorgegeben; zusätzlich wird noch bei der Konzentration 500 µE/ml beobachtet.

Da das Hauptaugenmerk auf die Lipolyse gerichtet sein soll, wird nur die Glycerinmessung durchgeführt, zudem sich bei unseren näher zu betrachtenden Insulinkonzentrationen bei der CO_2-Messung noch gar keine Reaktion zeigt.

Als Ergebnis sind also zu erwarten, einmal eine Aussage, ob eine Stoffwechseldifferenz besteht zwischen dem Fett Normalgewichtiger und dem Adipöser. Zudem müße sich das differente Stoffwechselgeschehen bei verschiedenen Hormonzugaben abzeichnen; also übertragen ausgedrückt z.B. die Wirkung der Schilddrüsenhormone bei Null-Diät und bei normaler Kost auf den Fettstoffwechsel.

7.1.2. A D I P Ö S - D E F I N I T I O N

Wie gerade beschrieben soll also eine Gruppe Adipöser einer Gruppe Normalgewichtiger gegenübergestellt werden. Dabei ist von großer Bedeutung, wo die Grenze von Normalgewicht zu Adipositas gelegt wird. Verglichen werden immer Gewicht und Körpergröße. Eine gängige Formel für das Idealgewicht ist, daß man von der Größe in cm 100 abzieht und von diesem Wert dann 10 % abzieht ($9/10 \cdot$(Größe - 100)). Dieser Wert wird jetzt als Idealgewicht postuliert. Die obere Grenze des tolerierten Normalbereiches wird erreicht, wenn das Gewicht den Wert Idealgewicht plus 20 % erreicht. Läßt man dann einen Sicherheitsabstand von 10 % , so könnte man definieren, daß eine Adipositas dann gegeben ist, wenn das Gewicht 30 % über dem Idealgewicht liegt. Die Grundlagen für diese Idealgewichtsberechnung boten Versicherungsgesellschaften, die bei ihren Versicherten Untersuchungen über Morbidität und Mortalität anstellten. Dabei ergab sich, daß die Personen mit dem oben definierten

Idealgewicht für die Gesellschaft die längsten Beitragszahler waren.
Rein mathematisch erscheint diese Formel unbefriedigend. Es wird die Größe, als eine eindimensionale Größe, mit dem Gewicht verglichen, das sich nach der Formel $\varrho \cdot V$ berechnet und - nimmt man ein konstantes spezifisches Gewicht an - einzig verändert wird durch seine direkte Proportionalität zum Volumen und somit eine dreidimensionale Größe darstellt. Will man also Größe und Gewicht miteinander vergleichen, wäre der mathematische Ansatz

$$\text{Größe} \,/\, \sqrt[3]{\text{Gewicht}} \qquad \text{am gegebensten;}$$

dabei werden zwei eindimensionale Größen verglichen. Dieser Kurvenzug stellt keine Gerade dar wie die Idealgewichtskurve. Diese Formel $\text{Größe}/\sqrt[3]{\text{Gewicht}}$ beschreibt Sheldon [40] und bezeichnet das Rechenergebnis als Ponderalindex.

Sheldon benutzt diesen Ponderalindex als eine Meßgröße in seinem Konstitutionsschema. Er beschreibt drei Konstitutionstypen,die realiter praktisch nicht vorkommen (im Gegensatz zu den Kretschmertypen). Jede Person trägt alle drei Konstitutionsanteile in sich, jeweils in wechselnder Ausprägung; dabei erstreckt sich das Bewertungsschema von 1-7 für jeden Anteil. Sheldon unterscheidet bei seinen Typen endomorphe Geprägtheit, die er als rundwüchsig, "adipös" beschreibt, den mesomorphen Anteilals muskuläres Äquivalent und die ektomorphe Komponente, die sich durch Schlankwüchsigkeit auszeichnet.
(Diese kurzen Charakterisierungen sind hier allzu vereinfachend wiedergegeben und entsprechen nicht der Kretschmerschen Einteilung, wenn die stichwortartige Beschreibung auch diesen Eindruck erwecken könnte).

Wieder zurück zum Ponderalindex. Sheldon fand bei Personen mit einem Ponderalindex über 43,4 ein ausgeprägtes Überwiegen des ektomorphen Anteils - bei einem Ponderalindex unter 39,8 das Überwiegen seines endomorphen Anteils. So sieht er

als Normalverteilung und Normalgewichtsbereich den Ponderalindexbereich zwischen 39,8 und 43,4 an. In diesem Bereich sind die drei Anteile mehr oder weniger gleichmäßig verteilt, und das Maximum der Dreierkombinationen liegt auch in diesem Bereich. Diese beiden Trennwerte wurden von Sheldon statistisch gefunden bei seinen Untersuchungen an 4000 Studenten.

In unserer Fragestellung ist nun die Abgrenzung zwischen Adipös und Normalgewichtig nötig, so daß sich als Trennwert der Ponderalindex von 39,8 anbietet. Zeichnet man beide Kurven - die Sheldonschen Kurven und die Idealgewichtskurve - übereinander, so sieht man, daß die Idealgewichtskurve bei Körpergrößen über 1,80 m schon in den ektomorphen Extrembereich Sheldons kommt und somit sicher nicht mehr relevant ist. Läßt man als obere Grenze des Normalbereichs gelten Idealgewicht plus 20 % , so erreicht diese Linie bei Größen unter 1,60 m schon den extremen endomorphen Bereich der Sheldonschen Darstellung und erscheint somit auch fraglich. Somit kann man der Idealgewichtsskala bestenfalls eine annähernde Richtigkeit im Größenbereich zwischen 1,6-1,8 m zusprechen.

Für unsere Untersuchungen wurde der Ponderalindex von 39,8 von Sheldon benutzt, um Normalgewichtige von Adipösen zu trennen.(Abb. 7)

7.2 AUSGEWERTETER VERSUCH

Ausgeführt wurde der Versuch unter den oben beschriebenen Bedingungen; dabei standen fünf Normalgewichtige (Ponderalindex 42,1/41,4/40,8/40,4/40,25) fünf Adipösen (Ponderalindex 39,6/39,2/39,1/37/36,7) gegenüber (Abb. 8).

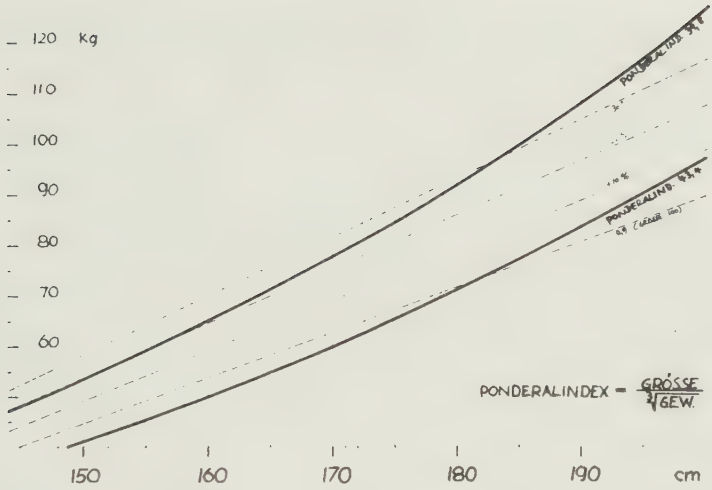


Abb. 7: Vergleich Ponderalindex/ Idealgewicht

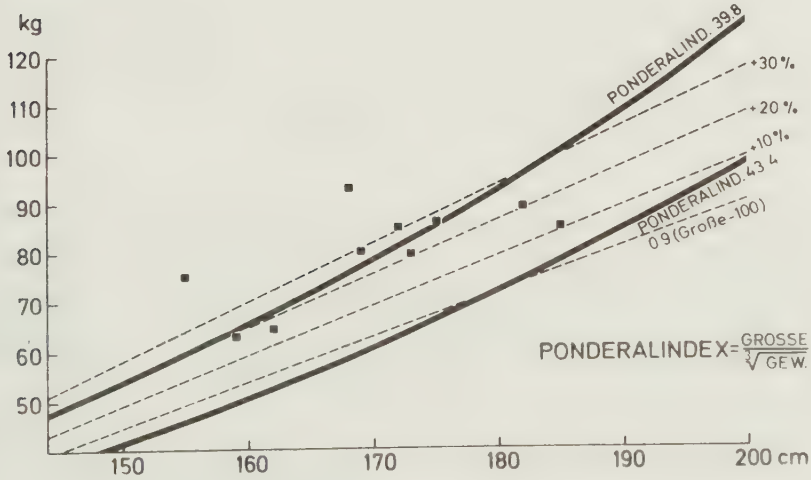


Abb. 8: Ausgewertete Proben im Ponderalindexschema

Gemessen wurde die freigesetzte Glycerinmenge. Als Bezugsgrösse wurde die gemessene DNA verwendet.

Der Triglyceridgehalt wurde ebenfalls bestimmt, jedoch zeigte er sich als Bezugsgröße ungeeignet. Der Grund dafür war, daß die zur Bestimmung kommende Fettzellsuspension schon freie Triglyceride enthielt, die aus bei der Fettzellisolierung zerstörten Zellen stammten, und deren Anteil, je nachdem wieviel Zellen bei der Isolierung zerstört wurden, schwankte. Somit konnte mit dem bestimmten Triglyceridwert keine Aussage über den wahren Triglyceridgehalt der Fettzellsuspension gemacht werden. Der Triglyceridgehalt als Bezugsgröße zeigte sich somit als hinfällig.
(Bei der DNA-Bestimmung tritt dieses Problem nicht auf, da die Zelltrümmer der zerstörten Zellen in der wässerigen Phase bleiben, die beim Auswaschen der Kollagenase entfernt und verworfen wird).

7.3. BESCHREIBUNG DER VERWENDETEN STATISTISCHEN METHODE: VARIANZANALYSE

(nach Dr. V.W. Rahlfs)

Aufgabe der statistischen Analyse ist die Abschätzung des Einflußes von T_3 und T_4 , Insulinkonzentrationen und Gewicht auf die Meßwerte. Zu berücksichtigen ist dabei, daß ein und dieselbe Probe unter sämtlichen T_3/T_4- und Insulinbedingungen getestet wurde, natürlicherweise jedoch nicht unter beiden Gewichtsbedingungen.

Im Sinne der Varianzanalysen-Technik handelt es sich also um

einen vierfaktoriellen Versuchsplan, wobei der Probenfaktor dem Gewichtsfaktor hierarchisch untergeordnet ist, die anderen Faktoren jedoch gekreuzt sind. Für das Testen der Versuchseffekte ist dabei zu beachten, daß der Probenfaktor als zufällig (ausgewählt aus einer großen Population) die überigen drei Faktoren jedoch als fix anzusehen sind. Berechnungsbeispiele für diesen Varianzanalysentyp findet man u.a. unter der Bezeichnung "split-plot-design" bei Kirk (S. 289 f.) [41], unter dem Namen "three-factor experiment with repeated measures" bei Winer (S. 539) [42], schließlich auch unter der Überschrift "Time a replicote within places" bei Bliss [43] (S. 385 f.). Die in den zitierten Werken abgeleiteten Erwartungswerte der Effekte sind auch für die vorliegende Datenstruktur gültig.

Das strukturelle Modell für diesen Versuchsplan ist (hierzu z.B. Kirk S.299) :

$$x_{ijkm} = \mu + \alpha_i + \pi_{m(i)} + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{ik} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \beta\pi_{jm(i)} + \gamma\pi_{km(i)} + \beta\gamma\pi_{jkm(i)} + \varepsilon_{0(ijkm)}$$

Wobei die verschiedenen Ausdrücke bedeuten:

α_i	=	Effekt der i-ten Gewichtsgruppe
$\pi_{m(i)}$	=	Effekt der m-ten Probe innerhalb der i-ten Gewichtsgruppe
β_j	=	Effekt der j-ten T-Gruppe
γ_k	=	Effekt der k-ten Insulingruppe
$\alpha\beta_{ij}$	=	Interaktion zwischen Gewicht und T-Gruppe
$\alpha\gamma_{ik}$	=	Interakt. zw. Gewichtsgruppe und Insulingruppe
$\alpha\beta\gamma_{ijk}$	=	Interakt. zw. Gew., T-Klassifikation und Insulin
$\beta\pi_{jm(i)}$	=	Interakt. der T-Gruppe und Probe innerhalb Gewichtsgruppe
$\gamma\pi_{km(i)}$	=	Interakt. von Insulin u. Probe innerh. Gew.gr.
$\beta\gamma\pi_{jkm(i)}$	=	Interakt. von T, Insulin und Probe innerhalb Gewichtsgruppe
$\varepsilon_{0(ijkm)}$	=	Restfehler

Wenn man die Erstellung der Varianzanalysentabelle über explizite Berechnung dieses Linear-Modells vornimmt, hat das den Vorteil, daß sich die Anpassung der Daten an das Modell überprüfen läßt. Nach Berechnung der Modellgleichung lassen sich nämlich durch Einsetzen der für jede Probe charakteristischen Werte die vom Modell vorhergesagten Werte ermitteln. Die Differenz der vom Modell vorhergesagten Werte von den tatsächlichen Werten, die sog. Residuen, geben Aufschluß über die Anpassung des Modells.
Aus diesem Grund wurde die Berechnung der Varianzanalyse über das Linear-Modell vorgenommen.

Gegenüberliegende Seite 47 : Tabelle 1 (s.S. 48)

PROBEN	./. 0	./. 50	./. 500	T_3 0	T_3 50	T_3 500	T_4 0	T_4 50	T_4 500	POND. IND.
x_1	21.6	34.2	12.6	49.6	41.5	36.1	32.5	34.25	32.5	36.7
x_2	18.88	15.29	16.6	12.6	16.19	15.29	15.29	16.2	16.2	37
x_3	10.49	4.84	6.46	8.86	6.46	10.49	4.03	4.84	7.25	39.1
x_4	8.97	5.71	8.35	8.39	6.22	7.74	6.22	4.96	4.34	39.2
x_5	45.9	49.9	39.85	49.25	46.1	44.9	32.95	31.15	34.2	39.6
$1/5 \sum_{n=1}^{5} x_n$	21.9	22	16.8	25.2	23.3	23	18.2	18.3	18.9	
x_6	59.2	56	59.2	79	73.8	73.8	59.2	60.6	60.6	40
x_7	21.85	19.5	18.3	16.75	15.65	15.2	14.82	14.85	13.26	40.25
x_8	54	51.6	~~34.45~~ 42.93	56.5	49.2	49.2	41.7	~~21.02~~ 27.72	39.3	40.4
x_9	24.7	30.55	32.9	40	29.4	31.75	30.55	21.15	28.2	40.8
x_{10}	27.4	31.2	27.4	34.6	23.6	16.1	21.8	17	18.9	41.4
$1/5 \sum_{n=6}^{10} x_n$	37.5	37.8	36.1	45.4	38.3	37.2	33.6	28.3	32.1	

µMol Glycerin / µg DNA

8. E R G E B N I S S E

Die gemessenen Ergebnisse sind in Tabelle 1 , Seite47 dargestellt. In dieser Tabelle sind zwei Werte in Probe 8 (gekennzeichnet) verändert. Die ursprünglichen Werte zeigten sich als Ausreißer im Wahrscheinlichkeitsnetz der Varianzanalyse. Für die Zwecke der endgültigen Datenanalyse wurden hier die vom Modell vorhergesagten Werte eingesetzt, was die geringste Verzerrung der Aussage hervorrufen dürfte.

Abb. 9

Die Abb. 9 zeigt die Darstellung der Residuen (mit den beiden korrigierten Werten) im Wahrscheinlichkeitsnetz. In dieser Darstellung sollen die Residuen deutlich eine Gerade annähern. Bei der sich ergebenden Kurve sind die Residuen also als akzeptabel zu bezeichnen, und somit ist die Modellanpassung gewährleistet.

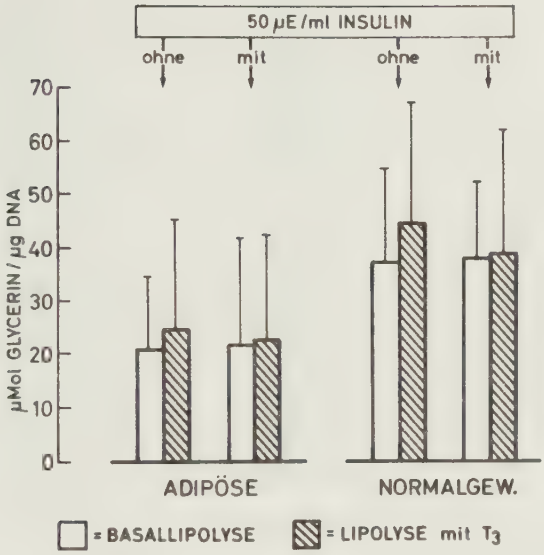


Abb. 10

In Abbildung 10 sind die Mittelwerte von Probe 1 bis 5 und von Probe 6 bis 10 unter den auf der Abbildung angegebenen Bedingungen graphisch dargestellt. x_1 - x_5 umfaßt das Kollektiv der Adipösen - x_6 - x_{10} stellen die Normalgewichtigen dar. Allein aus dem Vergleich der Mittelwerte möchte man schließen, daß die Lipolyse bei den Fettzellen der Normalgewichtigen höher ist als bei den Fettzellen Adipöser. Die varianzanalytische Auswertung ergibt allerdings, daß weder eine Wechselwirkung von Gewichtsfaktor zu Proben, zu dem T_3T_4-Effekt noch zu dem Insulineffekt besteht, und somit die Variable Gewicht (adipös ./. normalgewichtig) in keiner Abhängigkeit zu den anderen Variablen steht, d.h. der Gewichtsfaktor hat keinen Einfluß auf die Stoffwechselleistung der Zellen bezüglich der untersuchten Hormonkombinationen.

ANALYSIS OF VARIANCE

VARIATION DUE TO	DF	SUM OF SQUARES	MEAN SQUARE
TOTAL	89	30493,527160	
REGRESSION	57	30099,854449	528,067622
RESIDUAL	32	393,672711	12,302272
SET (2, 2)	56	24689,268311	440,879791
DIFFERENCE	1	5410,586138	5410,586138
SET (3, 2)	49	8187,673334	166,463129
DIFFERENCE	8	21042,181111	2742,772639
SET (4, 2)	55	29329,282909	533,259689
DIFFERENCE	2	770,571840	385,285770
SET (5, 2)	53	30018,863933	565,797510
DIFFERENCE	2	80,991416	40,495708
SET (6, 2)	41	28817,927227	702,876274
DIFFERENCE	10	1281,927222	80,120451
SET (7, 2)	55	29969,271522	544,895846
DIFFERENCE	2	130,582927	65,291463
SET (8, 2)	53	30041,153967	566,330072
DIFFERENCE	2	51,700482	25,850241
SET (9, 2)	41	29859,247813	728,274237
DIFFERENCE	10	240,606636	15,037915
SET (10, 2)	53	29964,412426	565,366274
DIFFERENCE	4	133,441053	33,360488
SET (11, 2)	53	30044,589424	566,879046
DIFFERENCE	4	55,265024	13,816256

Abb. 11

Abbildung 11 zeigt das varianzanalytische Ergebnis. Dabei stellt Set(2,2) den Gewichtsparameter dar. Set(4,2) steht für die T_3T_4-Wirkung, in Set(5,2) ist der Gewichtsfaktor mit der Schilddrüsenwirkung gekreuzt. Der Parameter für die Insulinwirkung findet sich in Set(7,2). In Set(8,3) ist Gewicht mit Insulinwirkung gekreuzt. Schließlich erfüllt Set(10,2) die Kombination von Schilddrüsenhormon- und Insulinwirkung. Zu guterletzt wurde noch in Set(11,2) Gewicht, Schilddrüsenhormon und Insulin kombiniert.

Zur Signifikanzberechnung vergleicht man die mean square Differenzwerte miteinander. Dabei wird

Set(2,2)	mit	Set(3,2)	(=Proben)
Set(4,2) Set(5,2)	mit	Set(6,1)	(=T_3T_4 x Proben)

Set(7,2)
Set(8,2) mit Set(9,1) (=Ins. x Proben)

Set(10,2)
Set(11,2) mit mean square residual (=T_3T_4 x Ins. x Proben)

verglichen.

Dabei ergibt sich also für sämtliche Gewichtswechselwirkungen (Set(2,2) ; Set(5,2) ; Set(8,2) ; Set(11,2)) keine Signifikanz, so daß die Gewichtsdifferenz keinen Unterschied in der Basis- noch in der stimulierten Lipolyse mit sich bringt.

Schilddrüsenhormon- und Insulinwirkung

Bei der Signifikanzberechnung von Set(4,2), Set(7,2) und Set(10,2) ergibt sich eine Signifikanz von $P < 0{,}05$.
Das heißt also, sowohl die Schilddrüsenhormone wie das Insulin sind bei der Signifikanz von 5% wirksame und sich unterscheidende Einflußgrößen.

	./.	T_3	T_4
0 µE/ml Insulin	29.26	35.29	25.91
50 µE/ml	29.88	30.81	23.27
500 µE/ml	26.46	30.06	25.48

Tabelle 2

Die Tabelle 2 zeigt die Erwartungswerte für das um die nicht-signifikanten Einflußgrößen reduzierte Vorhersage-Modell. In diesem Modell waren lediglich die Insulin-Variablen und die T-Variablen, sowie deren Wechselwirkung vertreten.

Daraus ergibt sich folgendes:

T_3 - Wirkung

Für die T_3-Wirkung zeigt sich, daß bei niederen Insulindosen (hier 0 Einheiten Insulin) T_3 eine lipolytische Aktivität an der menschlichen Fettzelle besitzt. Bei etwa 50 uE Insulin ist diese lipolytische Aktivität nicht auffällig und es besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen basaler und stimulierter Lipolyse (Abb. 10 , Abb. 11).

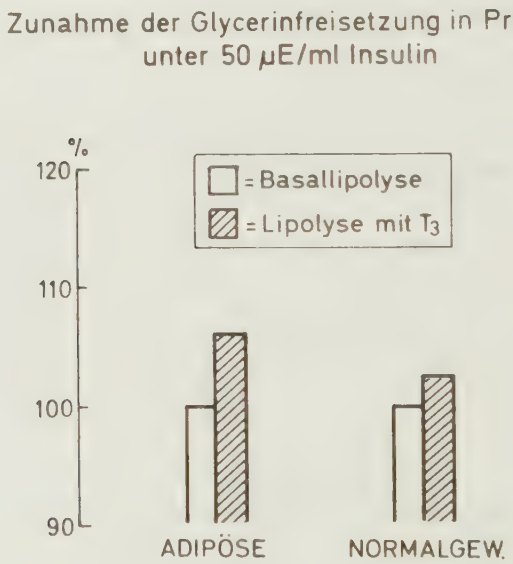


Abb. 11

T_4 - Wirkung

Betrachtet man die Lipolyse bei T_4-Einwirkung, so ergibt sich beim Vergleich mit der Basislipolyse kein lipolytischer Effekt. Ja nach den Ergebnissen, die unter unseren Bedingungen zustandegekommen sind, zeichnet sich eher eine Reduktion der durch T_4 beeinflußten Lipolyse gegenüber der basalen Lipolyse ab (Tabelle 2).

9. DISKUSSION

Die Fettzellen Normalgewichtiger und Adipöser zeigen bei unseren Untersuchungen keinen statistisch signifikanten Unterschied in ihrer Reaktion auf die gegebenen Hormone. Ehe dieses Ergebnis erörtert wird, möchte ich kurz ein paar Bemerkungen zur Fettzellisolierung vorausschicken und den Rahmen abstekken, unter dem die Ergebnisse zustande kamen.

Unser Reaktionssubstrat waren isolierte Fettzellen. Die Vorzüge, die das Arbeiten mit isolierten Fettzellen bietet, sind schon in der Einleitung erwähnt worden: also der gleichmäßige und sofortige Angriff des Inkubationsmedium an die Fettzelle und an jede Fettzelle, da nicht erst Bindegewebe in mehr oder minder dicker Schicht durchdrungen werden muß, wie bei z.B. Fettbröckchen. Des weiteren kann die Aufteilung der Fettzellsuspension in die Inkubationsgefäße schnell erfolgen und so eine Schädigung der Zellen durch zu langes Manipulieren verhindert werden. Dieser Zeitfaktor fällt bei der fat-pad-Methode ins Gewicht, da jedes Fettbröckchen abgewogen werden muß, um eine Bezugsgröße zu erhalten. Dabei wird zwangsläufig das Bindegewebe mitgewogen. Da jedoch der Quotient Bindegewebe/Zellen nicht als konstant anzusehen ist, ist bei stark wechselnder Bindegewebsmenge eine erhebliche Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten.

Gewisse Nachteile könnten daraus erwachsen, daß, um die Fettzellen zu isolieren, das Bindegewebe, in dem die Zellen eingebettet sind, enzymatisch zerstört wird. Dabei besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß die Zellen selbst angegriffen werden (Grieß und Steinecke(1967)[44]). Gliemann (69)[45] beschreibt, daß durch die Isolierung die äußeren beiden Schichten der dreischichtigen Zellmembran abgetragen würden. Es ist

damit nicht erwiesen, daß wandständige Rezeptoren zerstört werden. Nimmt man es als Extremfall jedoch an, so vermag sowohl Insulin (Hepp(71)[46] : Insulin beeinflußt Adenylatzyclasesysrem in einer zellfreien Partikelpräparation) wie auch T_3 und T_4 zu wirken (Schilddrüsenhormone dringen in Zelle ein : Hušek(74)[47]).

(Die erwähnte " trypsin like " Proteinase in unserer Kollagenase ist nicht gleichzusetzen mit Trypsin (Kono(72)[48]) , so daß dessen Rezeptorinaktivierung und ILA-Effekt nicht in Erwägung zu ziehen ist (Robinson(72)[49] , Kono(69)[50] , Crofford (69)[51])).

Das Bindegewebe, das bei unseren isolierten Zellen entfernt ist, dient möglicherweise nicht nur als blose Trägersubstanz für die Fettzellen. Es scheint vielmehr, daß das Stroma im weitesten Sinne mit in den Stoffwechsel der Fettzellen einbezogen ist (Grieß und Steinecke(67)[44]) und ein eventuell koordiniertes Stoffwechselgeschehen zwischen Bindegewebe und Fettzellen vorliegt. Hepp(69)[52] gibt z.B. an, daß er in den Fettzellen selbst nur 30% der in einem fat pad gefundenen Phosphodiesteraseaktivität gefunden hat, so daß 70% der Phosphodiesterase im Stroma vorlagen. Bezüglich des ATP - Gehaltes gibt Bihler(70)[53] an, daß dieser im intakten Gewebe wesentlich höher war, als in den isolierten Fettzellen. Da wir mit isolierten Zellen arbeiten, können wir auf eine mögliche Interaktion zwischen Zelle und Bindegewebe nicht zurückgreifen.

Als ein Hauptergebnis unserer Untersuchungen ergibt sich, daß T_3 eine signifikante Steigerung der Lipolyse in gleicher Weise bei Normalgewichtigen und Adipösen bewirkt. Diese Signifikanz zeigt sich jedoch nur bei 0 μE Insulin/ml. Wird dem Inkubationsmedium Insulin zugesetzt, so zeigt sich schon bei

50 µE/ml ein nahezu völliges Erliegen der durch T_3 bewirkten Lipolysesteigerung bei 0 µE/ml Insulin. Bei der Inkubation von Fettzellen nur mit Insulin (ohne T_3) ergibt sich bei 0 und 50 µE/ml keine Änderung der Lipolyseaktivität; erst bei der unphysiologisch hohen Konzentration von 500 µE/ml zeigt sich eine geringe Hemmung der Lipolyse.
Zwar findet Gries(68)[54] bei seinen Versuchen, daß bei einer Insulinkonzentration über 33 uE/ml sowohl die Glycerin- wie auch die FFA-Produktion zum Erliegen kommt; diese Feststellung scheint nun etwas starr zu sein,und Galton(67)[16] beschrieb schon ein Jahr früher den reduzierten antilipolytischen Effekt. Zu einem weiteren funktionellen Ergebnis kamen Burns(68)[55] und Lisch(71)[56] , die beschreiben, daß bei erhöhter Basallipolyse Insulin eine Reduktion der Lipolyse bewirkt, bei geringer oder normaler Basallipolyse Insulin keine signifikante Änderung der Lipolyse bewirkt.

Die Befunde dieser Autoren stimmen überein mit unseren eben geschilderten Ergebnissen. Betrachtet man unsere Ergebnisse bei 0, 50, 500 µE/ml Insulin ohne Schilddrüsenhormon und dieselbe Reihe mit T_3, so zeigt sich, daß bei offensichtlich normaler basaler Lipolyse Insulin keinen Einfluß auf die Lipolyse hat; zumindest nicht bei den physiologischen Konzentrationen. Bei dem unphysiologischen Wert von 500 µE/ml zeigt sich eine geringe Hemmung der Lipolyse, was durch Inkrafttreten eines Lipolysehemmechanismus bei dieser hohen Konzentration zu erklären wäre. Bei den mit T_3 stimulierten Fettzellen zeigt sich bei 0 Insulin eine gesteigerte Lipolyse. Diese gesteigerte Lipolyse wird durch 50 µE/ml wie 500 µE/ml Insulin reduziert.

Ein noch besseres Verständnis für den Umstand, daß T_3 nur bei sehr niedrigen Insulinkonzentrationen einen lipolytischen Effekt zeigt, gibt eine Betrachtung der physiologischen Wir-

kung von Glucose und Insulin auf den Zellstoffwechsel. Zwar wurde in unseren Versuchen die Glucosekonzentration immer konstant gehalten und nur die Insulinkonzentration variiert, physiologischer Weise folgt ein Insulinanstieg aber ja nur einem Anstieg der Blutglucose. So führt Froesch(67)[57] aus, daß Insulin eine Lipaseproduktion stimuliert, um gespeichertes Lipid abzubauen, diese gespeicherte Lipase jedoch inaktiv hält, so daß die Lipase erst bei fallendem Insulinspiegel zur Wirkung kommt. Dies bedeutet, daß während einer Hyperglycämie Insulin die Energiedepots in der Fettzelle aufzufüllen sucht durch die Synthese von Triglyceriden und durch Reduzierung der Lipolyse. Fällt dann der Glucosespiegel und damit der Insulinspiegel, so wird die Lipase aktiv und die Lipolyse setzt ein. Aus dieser Betrachtung ergibt sich die gegenläufige Wirkung von T_3 und erhöhten Insulinkonzentrationen.

Für die T_4 - Wirkung ergab sich bei unseren Versuchen keine lipolytische Wirkung. Auch Myat(64)[58] gibt keine lipolytischen Eigenschaften für T_4 an,und Brecht(67)[59] meint, daß es ähnlich wie T_3 eine Überempfindlichkeit gegenüber Adrenalin bewirke und den lipolytischen Einfluß des Adrenalins noch potenziere. Anhand unserer Ergebnisse läßt sich keine Aussage über die Wirkung des T_4 machen; ja es zeigt, jedenfalls in unserer Inkubationsperiode von 90 min, eher einen antilipolytischen Effekt verglichen mit der Probenreihe, die nur 0, 50, 500 µE/ml Insulin enthält. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund von Slavin(70)[60] , der bei seiner Inkubation von Fettgewebe in Substrat, das Insulin und Thyroxin enthielt, feststellte, daß die Zellen sich vergrößerten, ja sogar größer wurden als bei der Inkubation nur mit Insulin. Man könnte aus diesen spärlichen Ergebnissen die hypothetische Schlußfolgerung ziehen, daß T_4 die Zelle derart sensibilisiert, daß sowohl der Einfluß eines lipolytischen wie auch eines antilipolytischen Hormones verstärkt wird. Diesem Konzept einer All-

gemeinen Sensibilisierung käme auch der Befund von Slavin(70)[60] entgegen, der eine erhöhte Zellnekrose bei Inkubation in nur T_4 - haltigem Medium feststellte, die sich nicht mehr zeigte, als er Insulin zusetzte.

Wie die Zelle und ihr Metabolismus durch die Hormone beeinflußt werden, ist noch nicht vollkommen geklärt. Ein zur Zeit anerkanntes Modell ist folgendes: Aus ATP bildet sich 3'5' AMP; diese Reaktion wird von der Adenylcyclase katalysiert. 3'5' AMP wird unter dem Einfluß von Phosphodiesterase in 5' AMP verwandelt. Schlüsselsubstanz in dieser Reaktionsfolge ist das 3'5' AMP. Lipolytische, antilipolytische und lipogenetische Substanzen wirken nun z.B. auf die Adenylcyclase ein und regulieren damit die 3'5' AMP-Konzentration. So soll eine Verringerung des 3'5' AMP, bedingt durch Insulin, eine Umwandlung von aktiver Lipase in die inaktive Form bewirken - diese Reaktion würde dem antilipolytischen Effekt des Insulins Rechnung tragen. Wird nun die Lipolyse z.B. durch Epinephrin stimuliert, so erhöht sich der 3'5' AMP-Gehalt in der Zelle; daraus folgt nach obigem Konzept, daß die inaktive Lipase in die aktive Form übergeführt wird. Gibt man nun Insulin hinzu, tritt der antilipolytische Effekt des Insulins in Erscheinung, d.h. der 3'5' AMP-Gehalt wird reduziert bzw. dessen Produktion wird verringert (Hepp(72)[61]).

Auf welche Weise unsere verwendeten Hormone T_3 und T_4 wirken, ist ebenfalls nicht völlig klar. Trijodthyronin soll nach Challoner(69)[62] einen früheinsetzenden und möglicherweise direkten Effekt auf die Mitochondrien haben. Des weiteren wirkt T_3 (Challoner(69)[62] und (70)[63]) sensibilisierend auf die A denylcyclase, so daß diese auf lipolytische Substanzen (z.B. Epinephrin) empfindlicher anspricht und damit die 3'5' AMP-Konzentration erhöht, die ihrerseits eine Umwandlung der inaktiven Lipase in die aktive Form bewirkt. Bei sehr hohen

Konzentrationen vermag T_3 nach Mandel(67)[64] und Challoner(70)[63] auch die Phosphodiesterase zu hemmen, wodurch wieder eine Erhöhung der 3'5' AMP-Konzentration bewirkt würde. Bei unseren Untersuchungen bewirkt T_3 einen direkten lipolytischen Effekt - über welchen Mechanismus nun immer ausgelöst - mit einer erhöhten Basallipolyse bei 0 uE/ml Insulin. Bei dieser gesteigerten Basallipolyse zeigt Insulin wie geschildert einen antilipolytischen Effekt.

Die Hormonreaktion der Fettzellen Adipöser und Normalgewichtiger unterscheidet sich bei unseren Untersuchungen nicht in signifikanter Weise. Betrachtet man nur die Mittelwerte unserer Inkubationsansätze (siehe vorigen Abschnitt), so erscheint die basale Lipolyse bei den Zellen Normalgewichtiger höher zu liegen als bei den Zellen Adipöser. Da dieser Verhalten nicht signifikant zum Ausdruck kommt, könnte man vorsichtig formulieren, daß sich bei unseren fünf Proben von Adipösen eine Tendenz zu einer verringerten zelleigenen Lipolyseaktivität abzeichnet, die bei einer höheren Probenzahl möglicherweise signifikant in Erscheinung tritt. Dem gegenüber lassen sich die Zellen von Adipösen wie von Normalgewichtigen in derselben Weise durch hormonelle Reize stimulieren, wie unsere Versuche gezeigt haben.

Diesem Konzept entsprechen nicht die Ergebnisse von Salans, Knittle und Hirsch (68)[11] und Preiss[12]. Allerdings mißt die Gruppe von Salans die CO_2-Freisetzung. Sie findet bei etwa gleichen Kontrollwerten bei ihrer Untersuchung an Fettgeweben Normalgewichtiger und Adipöser eine Steigerung der Glucoseoxidation zu CO_2 um 113 % bei Insulinzugabe (1000 uE/ml) bei Normalgewichtigen und nur eine Steigerung von 50 % bei dem Fettgewebe Adipöser.
Als morphologische Begründung für sein Ergebnis findet Salans, daß die Fettzellen bei Adipösen wesentlich vergrößert sind.

Mit dieser Auffaßung deckt sich die Explantatstudie von Smith(73)[65] mit menschlichen Fettzellen. Er teilte seine Gewebeproben in zwei Gruppen ein. Bei der einen Gruppe hatten die Zellen einen mittleren Durchmesser über 95 µm, bei der anderen unter 95 µm. Wurden die Gewebsproben mit Insulin inkubiert, ergab sich folgendes interessante Ergebnis: Bei den Gewebeproben mit der Zellgröße unter 95 µm bewirkte die Insulinzugabe ein Konstanthalten der Zellgröße während einer Woche Inkubation, bei der Gruppe mit einem Zelldurchmesser über 95 µm nahmen die Zellen an Größe ab. Smith schließt daraus, daß der lipogenetische Effekt des Insulins von der Zellgröße abhängt, während der antilipolytische Effekt von geringerer Bedeutung ist, da die großen Zellen ebenso empfindlich gegenüber dem antilipolytischen Effekt des Insulins sind wie die kleinen Zellen (Jakobson und Smith(72)[66]).

Salans, Knittle und Hirsch haben wie gesagt die CO_2-Produktion in Abhängigkeit von Insulin gemessen und fanden dabei eine Differenz bei den Zellen Normalgewichtiger und Adipöser. Wir haben die Glycerinfreisetzung gemessen und fanden dabei keine veränderte Stimulierbarkeit zwischen den Zellen Normalgewichtiger und Adipöser. Beide Befunde ließen sich mit den jüngsten Ergebnissen von Smith(73)[65] in Einklang bringen, wenn man in Betracht zieht, daß bei der CO_2-Messung der lipogenetische Effekt in komplexer Form in dem Messergebnis Ausdruck findet. Die Kontrollwerte waren bei Salans, Knittle und Hirsch bei beiden Gewichtsgruppen etwa gleich, das hieße, daß sich die zellimmanente Lipogeneseaktivität nicht unterscheidet zwischen dem Gewebe Normalgewichtiger und dem Adipöser, daß sich aber die Stimulierbarkeit der Lipogenese bei den beiden Gewebschargen unterscheidet. Bei unseren Untersuchungen über die Lipolyse ergab sich eine bei beiden Gruppen vorhandene gleiche Stimulierbarkeit der Lipolyse. Allerdings zeigte sich eine Tendenz zu einer verringerten zelleigenen unstimulierten Lipo-

lyseaktivität der Zellen Adipöser, die sich bei unseren Versuchen nicht signifikant darstellte.

Salans, Knittle und Hirsch wie auch Smith geben als morphologisches Kriterium die Zellgröße an. Wir hätten nun aus dem mikroskopischen Bild der Zellen Adipöser nicht mit Sicherheit auf die Adipositas schließen können, da meist ein weitgestreutes Größenspektrum der Zellen vorlag. Rabinowitz(70)[67] schreibt nun, daß sich die Stoffwechselaktivität von Fettgewebe von z.B. Kindern, Normalgewichtigen und Adipösen nicht unterscheidet, wenn die jeweiligen Fettgewebe Zellen mit weitgestreuter Größendifferenz enthalten. Diese unterschiedliche Zellgröße findet auch bei Goldrick(70)[68] Erwähnung, der berichtet, daß bei gleicher Körperfettmenge die Fettzellgröße bei verschiedenen Personen erheblich variieren kann. Björntorp(72)[69] geht noch einen Schritt weiter, wenn er meint, daß man den Grad der Adipositas nicht nach der absoluten Fettmenge beurteilen sollte, sondern die Zellgröße als Beurteilungskriterium wählen sollte.

Anhand der Darstellung über die Größenvarianz der Zellen läßt sich sagen, daß unser Ergebnis der nicht signifikanten Unterschiede der Basallipolyse zwischen den Zellen Normalgewichtiger und Adipöser nicht unbedingt als relevant anzusehen ist bei einer Probenzahl von jeweils fünf und im Sinne eines vorläufigen "data snooping" zu betrachten ist.

10. ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Versuche mit menschlichen Fettzellen von Adipösen und Normalgewichtigen ergab, daß T_3 bei niederen Insulinkonzentrationen eine signifikante Erhöhung der Lipolyse bewirkt. Dabei fand sich kein Unterschied in der Stimulierbarkeit der Lipolyse durch T_3 bei den Zellen Normalgewichtiger und Adipöser.

T_4 zeigte keine lipolytische Aktivität.

Als Tendenz läßt sich aus den vorläufigen Untersuchungen ablesen, daß eventuell die Zellen Adipöser eine zellimmanente verringerte Lipolyseaktivität haben.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. Kurt Schwarz sei für die Überlassung des Themas gedankt, Herrn Dr. G. G. Hofmann für die Unterstützung bei der Arbeit.

Besonderer Dank sei den Ärzten der Chirurgischen Universitätsklinik für ihre stete Hilfsbereitschaft ausgesprochen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Zenker, Pichlmaier, Rueff und Schaudig, Herrn Priv. Doz. Bedacht, Feifel, Grabiger, Spelsberg, Herrn Dr. Bauer, Duswald, Erpenbeck, Hauer und Kemkes.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 Patzold, U.: Hypertonie, Fettsucht und Konstitutionstyp
Med. Klinik 67 (1972) 1559

2 Schwalb H., Schimert G.: Das Herz bei Fettsucht
Med. Klinik 65 (1970) 1908

3 Müller R.: Zur Adipositas und ihren Begleitkrankheiten
Dtsch. Ges.wesen 18 (1963) 1907

4 Newburgh, J.H.: Obesity
Arch. Int. Med. 70 (1942) 1033

5 Rossier, P.H.: Die Fettsucht als psychosomatisches Geschehen
Psyche III (1949) 18

6 Stollreiter-Butzon, L.: Fettsucht als psychsomatische Symptombildung
Psyche IV (1950) 335

7 Karp, S.A., Pardes, H.: Psychological Differentiation (Field Dependence) in Obese Women
Psychosomatic Medicine 27 (1965) 238

8 Bruch, H.: Psychotherapie der kindlichen Fettsucht
in: Handbuch der Kinderpsychotherapie, Herausg.: G. Biermann, E. Reinhardt Verlag 1969, Seite 935

9 Ammon, K.: Die gestörte Mutter-Kind-Beziehung als Ursache psychosomatischer Erkrankungen aus sozialpsychologischer und psychoanalytischer Sicht
Dyn. Psych. 6 (1973) 98

10 Witkin, H.A.: Psychologische Differenzierung und Formen der Pathologie
Psyche 27 (1973) 555

11 Salans L.B., Knittle J.L., and Hirsch J.: The Role of Adipose Cell Size and Adipose Tissue Insulin Sensitivity in the Carbohydrate Intolerance of Human Obesity
J. Clin. Invest. 47 (1968) 153

12 Preiss H., Thamer G., Gries F.A., Solbach H.-G. und Jahnke K.: Der Einfluß von Noradrenalin auf die Lipidmobilisation aus subcutanem menschlichem Fettgewebe in vitro bei normalgewichtigen und adipösen Personen
Verh. der Dtsch. Gesellsch. für Med. (1968) 950

13 Krick, L.: Der Einfluß der Schilddrüsenhormone, des Adrenalins und Dexamethasons auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel isolierter Rattenfettzellen.
Dissertation (1973)

14 James R.C., Burns T.W., and Chase G.R.: Lipolysis of human adipose tissue cells: Influence of donor factors
J. Lab. Clin. Med. 77 (1971) 254

15 Mosinger B., Kuhn E., Kujalova V.: Action of adipokinetic hormones on human adipose tissue in vitro
J. Lab. Clin. Med. 66 (1965) 380

16 Galton D.J. and Bray G.A.: Studies on Lipolysis in Human Adipose Cells
J. Clin. Invest. 46 (1967) 621

17 Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effect of hormones on glucose metabolism and lipolysis
J. Biol. Chem. 239 (1964) 375

18 Gliemann, J.: Insulin-like activity of dilute human serum asseyed by isolated adipose cell method
Diabetes 14 (1965) 643

19 Gliemann, J.: Assay of Insulin-like Activity by the Isolated Fat Cell Method
Diabetologia 3 (1967) 382

20 Lisch H.-J., Sailer S., Sandhofer F. und Braunsteiner H.: Untersuchungen an isolierten menschlichen Fettzellen verschiedener Fettgewebsregionen. I. Beziehung zwischen relativem Körpergewicht und Zellvolumen
Klin. Wschr. 48 (1970) 1349

21 Potter V.R. and Elvehjem C.A.: A modified method for the study of tissue oxidations
J. biol. Chem. 114 (1936) 495

22 Lang K., Siebert G.: Aufarbeitung von Geweben und Zellen. In: Hoppe-Seyler-Thierfelder: Hdb. der phys. und phys.-chem. Analyse. 10. Auflage, Bd. II, Teil 2, Springer-Verlag 1955

23 Hess, B.: Methoden der enzymatischen Analyse
Hrsg. H.U. Bergmeyer , Verlag Chemie GmbH (1962)

24 Marmur, J.: A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro-organisms
J. Mol. Biol. 3 (1961) 208

25 Marmur, J.: A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms
in: Methods in Enzymology, Vol. VI Seite 726 , Academic Press 1963

26 Schmidt G., Thannhauser S.J.: A Method for the Determination of Desoxyribonucleic Acid, Ribonucleic Acid, and Phosphoproteins in Animal Tissues
J. Biol. Chem. 161 (1945) 83

27 Dische Z.: Color Reaktion of Nucleic Acid Components in: The Nucleic Acids Vol. I S. 285 , Academic Press Inc. 1955

28 Steel R., Sfortunato Th., Ottolenghi L.: A Micromethod for the Determination of the Nucleic Acids
J. Biol. Chem. 177 (1949) 231

29 Ayala W., Moore L.V., Hess E.L.: The Purple Color Reaktion Given by Diphenylamine Reagent
J. Clin. Invest. 30 (1951) 781

30 Burton, K.: A Study of the Conditions and Mechanisms of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid
Biochem. J. 62 (1956) 315

31 Ceriotti, G.: A Microchemical Determination of Desoxyribonucleic Acid
J. Biol. Chem. 198 (1952) 297

32 Hutchinson W.C., Downie E.D., Munro H.N.: Factors Affecting the Schneider Procedure for Estimation of Nucleic Acids
Biochim. Biophys. Acta 55 (1962) 564

33 Eggstein M., Kreutz F.H.: Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe. I. Mitteilung
Klin. Wschr. 44 (1966) 262

34 Eggstein, M.: Eine Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe II. Mitteilung
Klin. Wschr. 44 (1966) 267

35 Takahashi S., Seifter S.: Dye-Sensitized Photo-Inactivation of Collagenase A
Biochim. Biophys. Acta 214 (1970) 556

36 Robinson, Newsholme : Glycerolkinase activities in rat heart and adipose tissue
Biochem. J. 104 (1967) 2C

37 Kreutz, F.H.: Enzymatische Glycerinbestimmung
Kl. Wschr. 40 (1962) 362

38 Froesch, E.R.: Wirkungsmechanismus des Insulins: Die Insulinwirkung auf das Fettgewebe
in Diabetes,Seite 495

39 Lisch H.-J., Sailer S., Sandhofer F. und Braunsteiner H.: Untersuchungen an isolierten menschlichen Fettzellen verschiedener Fettgewebsregionen. II. Beziehungen zw. Zellvolumen und basaler Lipolyse
Klin. Wschr. 48 (1970) 1353

40 Sheldon, Stevens, Tucher: The Variety of Human Physique: An Introduction to Constitutional Psychology
Hafner

41 Kirk, R.E.: Experimental design: Procedures for the behavioral sciences
Belmont, California (1968); Brooks/Cole Publishing Company , S. 289

42 Winer, B.J.: Statistical principles in experimental design
McGraw-Hill, New York 1962 Seite 539

43 Bliss C.I. : Statistics in Biology , Band I
New York 1967 , McGraw-Hill

44 Grieß und Steinecke: Comparative Effects of Insulin on Adipose Tissue Segments and Isolated Fat Cells of Rat and Man
J. Clin. Invest. 46 (1967) 1413

45 Gliemann, J.: Action of Insulin on Isolated Fat Cells
Danish Med. Bull. 16 (1969) Suppl. 4, 1-42

46 Hepp, K.D.: Inhibition of Glucagon-stimulated adenylcyclase by Insulin
FEBS - Letters 12 (1971) 263

47 Hušek, Felt : Inability of human adipose tissue cells to differentiate between trijodthyronine (T_3) and Thyroxin (T_4)
Klin. Wschr. 52 (1974) 505

48 Kono: General Study of Methods of Preparation and Properties of dispersed Cells
IV. Intern. Congress of Endocrinology 72 (Washington)

49 Robinson C.A., Boshell B.R. and Reddy W.J.: Insulin Binding to Plasma Membranes
Biochim. Biophys. Acta 290 (1972) 84

50 Kono, T.: Destruction and Restoration of the Insulin Effector System of Isolated Fat Cells
J. Biol. Chem. 244 (1969) 5777

51 Crofford O.B., Minemura T. and Kono T.: Insulin-Receptor Interaction in Isolated Fat Cells
Advances in Enzyme Regulation Vol. 8 (1969) 219

52 Hepp K.D., Menahan L.A., Wieland and Williams R.H.: Studies on the Action of Insulin in Isolated Adipose Tissue Cells. II. 3'-5'-Nucleotide Phosphodiesterase and Antilipolysis
Biochim. Biophys. Acta 184 (1969) 554

53 Bihler I. and Jeaurenaud B.: ATP Content of Isolated Fat Cells. Effect of Insulin, Oubain, and Lipolytic Agents
Biochim. Biophys. Acta 202 (1970) 496

54 Gries F.A., Berger M. und Oberdisse K.: Untersuchungen zum antilipolytischen Effekt des Insulins am menschlichen Fettgewebe in vitro
Diabetologia 4 (1968) 262

55 Burns T.W. and Langley P.: Observations on Lipolysis with isolated adipose tissue cells
J. Lab. & Clin Med. Vol 72 (1968) 813

56 Lisch H.-L., Sailer S., Sandhofer F., Schennach W., Braunsteiner H.: Effekt von Insulin und Glucose auf die Lipolyse und die Reveresterung von freien Fettsäuren in isolierten Fettzellen des Menschen
Wien. Z. Inn. Med 52 (1971) 15

57 Froesch, E.R.: The Physiology and Pharmacology of Adipose Tissue Lipolysis : Its Inhibition and Implication for the Treatment of Diabetes
Diabetologia 3 (1967) 475

58 Myant, N.B.: The Thyroid and Lipid Metabolism
In: Lipid pharmacology (Ed. R. Paoletti) p. 299
Academic Press 1964

59 Brecht W.J. und Gordon E.S.: Die physiologische Rolle des Fettgewebes
Klin. Wschr. 45 (1967) 905

60 Slavin B.G. and Elias J.J.: Morphologic Changes in White and Brown Adipose Tissue by Insulin, Thyroxin and Cortisol in Organ Culture
Anat. Rec. 167 (1970) 213

61 Hepp K.D., Renner R., Mehnert H.: Studien zum Wirkungsmechanismus des Insulins am Fettgewebe: Antagonismus zwischen Insulin und lipolytischen Hormonen am Aktivierungssystem der Adenylzyklase
Verh. dtsch. Gesellsch. Inn. Med. 78 (1972) 1266

62 Challoner D.R.: A direct effect of triiodothyronine on the oxygen consumption of rat fat cells
Am. J. of Physiol. 216 (1969) 905

63 Challoner D.R. and Allen D.O.: An In Vitro Effect of Triiodothyronine on Lipolysis, Cyclic AMP-C^{14} Accumulation and Oxygen Consumption in Isolated Fat Cells
Metabolism 19 (1970) 480

64 Mandel L.R. and Knehl F.A.: Lipolytic action of 3,3',5' triiodthyronine, a cyclic AMP-phosphodiesterase inhibitor
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28 (1967) 133

65 Smith U. and Jacobsson B.: Studies of Human Adipose Tissue in Culture. II. Effects of Insulin and of Medium Glucose on Lipolysis and Cell Size
Anat. Rec. 176 (1973) 181

66 Jacobsson B. and Smith U.: Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells
J. Lipid. Res. 13 (1972) 651

67 Rabinowitz D.: Some Endocrine and Metabolic Aspects of Obesity
Ann. Rev. of Med. 21 (1970) 241

68 Goldrick R.B. and McLoughlin G.M.: Lipolysis and Lipogenesis from Glucose in Human Fat Cells of Different Sizes. Effects of Insulin, Epinephrin, and Theophylline
J. Clin. Invest. 49 (1970) 1213

69 Björntorp P., Grimby G., Sanne H., Sjöström L., Tibblin G. and Wilhelmsen L.: Adipose Tissue Fat Cell Size in Relation to Metabolism in Weight-Stabile, physically Active Men
Horm. Metab. Res. 4 (1972) 178

L E B E N S L A U F

Name : Gerhard Schneider
geboren: 2. Juni 1948 in Göggingen bei Augsburg
Eltern: Hedwig Schneider, geb. Schäfer &
Eugen Schneider

Volksschule: 1954 - 1959
Oberschule: Oberrealschule Augsburg (heute Holbein-Gymn.)
1959 - 1968
Abitur: Juli 1968

Universität: Ludwig-Maximilians-Universität in München
1968 - 1974
Vorphysikum 1969
Physikum April 1971
Staatsexamen Juli 1974